

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb,  
20. rujna, 2022

Klara Kašnar

**ULOGA Rab PROTEINA U  
USPJEŠNOSTI TRANSDUKCIJE  
ADENOVIRUSOM TIPA 26**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod komentorstvom dr. sc. Dragomire Majhen te dr.sc. Davora Nestića koji je pri izradi diplomskog rada bio neposredni voditelj.

Rad je izrađen u sklopu istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Endocitoza adenovirusa i urođeni imunosni odgovor“ (HRZZ-IP-2019-04-6048), voditeljice projekta dr. sc. Dragomire Majhen.

*Zahvaljujem dr. sc. Dragomiri Majhen i prof. Kseniji Durgo na pruženom prilici, poticajnom mentorstvu i strpljenju.*

*Zahvaljujem dr. sc. Davoru Nestiću na beskrajnom strpljenju, savjetima, trudu i vremenu uloženom u izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem na pomoći koju sam mogla zatražiti u bilo koje doba dana i noći. Hvala na svakoj kritici, komentaru i šalama koje su podigle atmosferu i olakšale mi rad u laboratoriju.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima koji su me poticali i ohrabivali kroz cijelo školovanje i proživljavali samnom sve uspone i padove. Zahvaljujem se bakama i cijeloj obitelji koja me bekrajno podupirala.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Diplomski rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Zavod za Biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Molekularna biotehnologija

### **ULOGA Rab PROTEINA U USPJEŠNOSTI TRANSDUKCIJE ADENOVIRUSOM TIPA 26**

*Klara Kašnar, univ. bacc.ing. biotechn., 0058213714*

**Sažetak:** Rekombinantni adenovirusni vektori koriste se kao viralni vektori u genskoj terapiji i vakcinaciji. Najčešće korišten adenovirusni vektor temeljen je na adenovirusu tipa 5 (HAdV-C5) čija je uporaba ograničena zbog visoke seroprevalencije pa se sve više istražuju manje seroprevalentni adenovirusi kao što je adenovirus tipa 26 (HAdV-D26). Rab proteini imaju brojne uloge u stanici, a smatraju se ključnim regulatorima staničnog transporta. U ovom radu ispitana je uloga Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11 proteina u endocitozi i unutarstaničnom putovanju HAdV-D26. Stanice su transficirane plazmidima koji sadrže gene za Rab proteine divljeg tipa (WT, engl. *wild type*) te je uspješnost transdukcije tih stanica uspoređena s uspješnošću transdukcije stanica transficiranih plazmidima koji sadrže gene za dominantno negativne (DN, engl. *dominant negative*) mutante Rab proteina. Zabilježena je manja uspješnost transdukcije u stanicama transficiranim s plazmidima koji kodiraju za DN mutante Rab proteina što ukazuje na ulogu Rab proteina u endocitozi i unutarstaničnom putovanju HAdV-D26.

**Ključne riječi:** adenovirus čovjeka tipa 26, Rab proteini, unutarstanično putovanje virusa

**Rad sadrži:** 73 stranice, 23 slike, 11 tablica, 124 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Ksenija Durgo

**Komentor:** dr. sc. Dragomira Majhen, v. znan. sur., IRB

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Davor Nestić, IRB

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. dr. sc. Dragomira Majhen., v. znan. sur., IRB (član)
4. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (zamjenski član)

**Datum obrane:** 20. rujna 2021.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Graduate Thesis**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Cell Biology and Signalling, Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

### **THE ROLE OF Rab PROTIENS IN THE ADENOVITUS TYPE 26 TRANSDUCTION**

*Klara Kašnar, univ. bacc.ing. biotechn., 0058213714*

**Abstract:** Recombinant adenoviral vectors are used as viral vectors in gene therapy and vaccination. The most used adenovirus vector is based on adenovirus type 5 (HAdV-C5), but its use is limited due to the high seroprevalence thus, less seroprevalent adenoviruses such as adenovirus type 26 (HAdV-D26) are investigated as alternative. Rab proteins have numerous roles in the cell and are considered key regulators of cellular transport. In this study we investigated the role of Rab5, Rab7, Rab9 and Rab11 proteins in endocytosis and intracellular trafficking of HAdV-D26. HAdV-D26 transduction was compared in cells transfected with plasmids containing genes for wild-type (WT) Rab proteins and cells transfected with plasmids containing genes for dominant negative (DN) mutants of Rab proteins. A lower transduction efficiency was observed in cells transfected with plasmids encoding dominant negative mutants indicating the role of Rab proteins in endocytosis and intracellular trafficking of HAdV-D26.

**Keywords:** human adenovirus type 26, Rab proteins, intracellular trafficking of viruses

**Thesis contains:** 73 pages, 23 figures, 11 tables, 124 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ksenija Durgo, PhD, Full professor

**Co-mentor:** Dragomira Majhen, PhD, Senior Research Associate, RBI

**Technical support and assistance:** Davor Nestić, PhD, RBI

#### **Reviewers:**

1. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (president)
2. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (mentor)
3. Dragomira Majhen, PhD, Senior research associate, IRB (member)
4. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September 20<sup>th</sup>, 2022

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. ADENOVIRUSI ČOVJEKA .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Struktura adenovirusa čovjeka.....	4
2.1.2. Genom adenovirusa .....	5
<b>2.2. INFEKCIJA ADENOVIRUSOM .....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Vežanje adenovirusa .....	7
2.2.2. Endocitoza adenovirusa .....	9
2.2.3. Bijeg adenovirusa iz endosoma .....	10
2.2.4. Citosolno putovanje adenovirusne čestice i unos adenovirusne DNA u jezgru .....	10
<b>2.3. ULOGA Rab PROTEINA U ENDOCITOZI TE UNUTARSTANIČNOM PUTOVANJU ADENOVIRUSA .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4. ZNAČAJ.....</b>	<b>14</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Kemikalije.....	15
3.1.2. Stanične linije .....	18
3.1.3. Replikacijski defektan adenovirusni vektor.....	18
3.1.4. Plazmidi .....	18
3.1.5. Uređaji i pomagala.....	19
<b>3.2. METODE .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Uzgoj stanica.....	20
3.2.2. Odmrzavanje i zamrzavanje stanica .....	21
3.2.3. Transfekcija stanica .....	21
3.2.4. Transdukcija.....	22
3.2.5. Imunofluorescencija.....	23
3.2.6. Određivanje uspješnosti transfekcije i transdukcije protočnom citometrijom.. .....	23
3.2.7. Određivanje uspješnosti transfekcije i transdukcije konfokalnom mikroskopijom .....	24
3.2.8. Restriksijska analiza plazmida i gel elektroforeza .....	25
3.2.9. Analiza Rab WT i Rab DN gena u programu CLC sequence viewer i NCBI-Blast-u .....	25
3.2.10. Umnažanje i pročišćavanje virusa centrifugiranjem u cezijevoj kloridu....	26
3.2.11. Određivanje koncentracije pročišćenih virusa.....	27



<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. ANALIZA PLAZMIDA .....</b>	<b>30</b>
4.1.1. Usporedba WT i DN tipova pojedinog Rab proteina .....	32
4.1.2. Restriksijska analiza i gel elektroforeza .....	34
<b>4.2. OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3. UMNAŽANJE I PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSNIH VEKTORA .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI TRANDUKCIJE A549 STANICA S HAdV-D26 PROTOČNOM CITOMETRIJOM NAKON TRANSFEKCIJE S DsRed-Rab PLAZMIDIMA.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI TRANDUKCIJE S HAdV-D26 KONFOKALNOM MIKROSKOPIJOM NAKON TRANSFEKCIJE S DsRed-Rab PLAZMIDIMA.....</b>	<b>53</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>62</b>

# 1. UVOD

Adenovirusi su najčešće korišteni vektori za prijenos gena u genskoj terapiji. Rekombinantni adenovirusni vektori koriste se za vakcinaciju i gensku terapiju tumora u obliku replikacijski defektnih adenovirusa koji omogućuju prolaznu ekspresiju gena. Adenovirusi kao vektori imaju brojne prednosti kao što je mogućnost umnažanja u visokom titru, infekcija mirujućih stanica i onih u diobi, široki tropizam te dobro poznavanje molekularne biologije adenovirusa i laka manipulacija adenovirusnim genomom (Lee i sur., 2017).

Najbolje proučeni i najčešće korišteni adenovirusni vektori su adenovirusi čovjeka tipa 2 (HAdV-C2) i tipa 5 (HAdV-C5), ali njihova uporaba ima ograničenja zbog visoke seroprevalencije. Stoga je sve više istraživanja usmjereno na proučavanje biologije i molekularnih mehanizama drugih tipova adenovirusa, a jedan od njih je adenovirus čovjeka tipa 26 (HAdV-D26) čija je seroprevalencija u populaciji niska (Vogels i sur., 2003). HAdV-D26 pripada podgrupi D, najvećoj podgrupi adenovirusa čovjeka, čiji predstavnici uzrokuju bolesti oka, gastrointestinalnog sustava i tonzila (Echavarría, 2008). Dosadašnja istraživanja opisuju receptore za HAdV-D26 na različitim staničnim linijama, dok je imunski odgovor na infekciju s HAdV-D26 istražen u brojnim *in vitro* te *in vivo* studijama, osobito zato što su vektori temeljeni na HAdV-D26 odobreni kao vakcine za upotrebu u ljudi. Ipak, uvelike nedostaju podaci vezani za događaje nakon vezanja HAdV-D26, što uključuje endocitozu, unutarstanično putovanje virusa te dopremu genoma do jezgre. Adenovirusi čovjeka koriste receptor-posredovanu endocitozu za ulazak u stanice, nakon čega u endosomima putuju po stanici sve do uspješnog izlaska iz endosoma. Slobodna adenovirusna čestica se uslijed transporta po mikrotubulima veže za jezgrine pore kako bi dopremila genom u jezgru stanice domaćina (Charman i sur., 2019). Tijekom tog puta infekcije, adenovirusi uspostavljaju niz interakcija sa staničnim proteinima.

Rab proteini imaju niz uloga u stanici kao što su posredovanje u endocitozi i recikliranje endosoma i receptora, a veliki dio Rab proteina ima ulogu u regulaciji staničnog transporta. Rab proteini međusobno su usko povezani te zbog niza funkcija imaju ulogu kao ključni regulatori staničnog transporta i organizacije (Kelly i sur., 2012). Razumijevanje njihove uloge omogućava razumijevanje adenovirusne endocitoze i putovanja kroz stanicu te samu biologiju adenovirusa.

Cilj ovog diplomskog rada je bio istražiti ulogu Rab proteina (Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11) u uspješnosti transdukcije epitelnih stanica čovjeka (A549) s adenovirusom čovjeka tipa 26 (HAdV-D26). U tu svrhu korišteni su plazmidi koji kodiraju za divlji tip ili dominantno-negativne verzije Rab proteina, optimizirani su uvjeti transfekcije stanica, umnožen je i pročišćen HAdV-D26 te su uspješnost transfekcije i transdukcije određene konfokalnom mikroskopijom i protočnom citometrijom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ADENOVIRUSI ČOVJEKA

Adenovirusi čovjeka (engl. *human adenovirus*, HAdV) pripadaju rodu *Mastadenovirus* porodice *Adenoviridae*. Rod *Mastadenovirus* obuhvaća više od 70 tipova HAdV, koji su na temelju hemaglutinacije eritrocita, onkogenog potencijala, genotipizacije i filogenetske analize podijeljeni u 7 podgrupa, označenih od A do G (HAdV-A do HAdV-G) (Lefkowitz i sur., 2018). HAdV su povezani s bolestima respiratornog sustava, oka i gastrointestinalnog sustava. Infekcije adenovirusima su najčešće asimptomatske kod imunokompetentnih osoba, a mogu izazvati teže simptome i smrt kod imunokompromitiranih osoba (Appaiahgari i Vrati, 2014; Chen i Lee, 2013; Mennechet i sur., 2019).

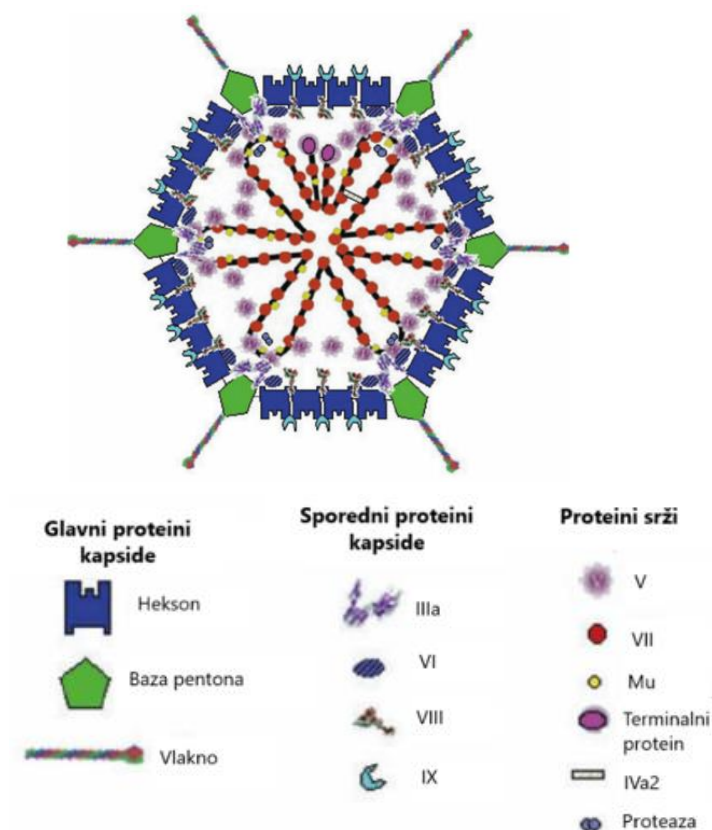
HAdV su prvi puta izolirani 1950-ih iz adenoidnih stanica (Rowe i sur., 1953; Hilleman i Werner, 1954) i od njihove prvotne karakterizacije postali su značajan model za proučavanje ulaska virusa u stanicu, transkripcije i replikacije DNA, prekrajanja mRNA, ekspresije proteina, kontrole staničnog ciklusa te tumorigeneze (Rux i Burnett, 2004). Jedna od najvažnijih primjena adenovirusa je kao vektora za prijenos gena. Adenovirusi čovjeka tipa 2 (HAdV-C2) i tipa 5 (HAdV-C5) najbolje su proučeni adenovirusi kao i najčešće korišteni adenovirusni vektori u kliničkim ispitivanjima u svrhu genske terapije, međutim njihova primjena kao vektora je djelomično ograničena zbog već postojeće stanične imunosti usmjerene prema proteinima kapside uslijed visoke seroprevalencije ovih virusa (Douglas, 2007). Stoga je sve više istraživanja usmjereno na proučavanje biologije drugih tipova adenovirusa i strategija kao što su genetičke i kemijske modifikacije kapside kojima bi se navedena ograničenja mogla prevladati (Greber, 2020; Kreppel i Hagedorn, 2021).

Jedan od tipova adenovirusa čija je seroprevalencija, tj. koncentracija neutralizirajućih protutijela u populaciji niska jest adenovirus čovjeka tipa 26 (HAdV-D26) (Vogels i sur., 2003). HAdV-D26 potiče urođenu i stečenu (staničnu i humoralnu) imunost, a u usporedbi šest niskoseroprevalentnih tipova adenovirusa pokazao je najveću imunogeničnost (Abbnik i sur., 2007). Zbog svoje niske seroprevalencije i poticanja povoljnog imunskog odgovora, HAdV-D26 je prepoznat kao povoljan tip HAdV za razvoj vektorskih vakcina. Dosad su dvije vektorske vakcine temeljene na HAdV-D26 odobrene za upotrebu u ljudi: vakcina protiv Ebole (European Commission, 2020) i vakcina protiv teškog akutnog respiratornog sindroma

koronavirusa 2 (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) (European Commission, 2021). Osim toga, vektor temeljen na HAdV-D26 se nalazi u više od 30 kliničkih ispitivanja i istražuje se kao vakcina protiv bolesti uzrokovanih virusom imunodeficijencije čovjeka (engl. *Human Immunodeficiency Virus*, HIV), respiratornim sincicijskim virusom (engl. *Respiratory Syncytial Virus*, RSV), virusom Zika, papiloma virusom čovjeka (engl. *human papillomavirus*, HPV) i drugima (Custers i sur., 2020).

### 2.1.1. Struktura adenovirusa čovjeka

Adenovirusna čestica građena je od proteinske kapside i srži gdje se nalazi dvolančana DNA vezana s proteinima srži (shematski prikazano na Slici 1). Kapsida se sastoji od tri glavna proteina (hekson, baza pentona i vlakno) i četiri sporedna proteina kapside (Waye i Sing, 2010). Hekson je homotrimer polipeptida II i svaku adenovirusnu česticu čini 240 kopija heksona. Na vrhovima ikozaedralne strukture virusne čestice nalazi se 12 pentona koji su nekovalentni kompleksi homopentamerne baze pentona i homotrimernog vlakna. Vlakno je sastavljeno od tri cjeline: repa (engl. *tail*), drška (engl. *shaft*) i glave (engl. *knob*). Uloga pentona je sudjelovanje u vezanju virusne čestice na stanične receptore i internalizaciji virusa. Proteini IIIa, VI, VIII i IX su sporedni proteini kapside koji ojačavaju čvrstoću virusne čestice. Osim proteina kapside, virusna čestica sastavljena je i od proteina srži (V, VII, Mu, Iva2, AVP te TP) koji ulaze u interakcije s dvolančanom DNA. Proteini VII i Mu vezani su na adenovirusnu DNA, a protein V ulazi u interakcije s kapsidnim proteinom VI te služi kao poveznica između srži i kapside. U srži je također smještena i proteaza (AVP) koja ima bitnu ulogu u sklapanju adenovirusne čestice (Russell, 2000; Russell, 2009; Gallardo i sur., 2021; San Martín, 2012; Kulanayake i Tikoo, 2021).

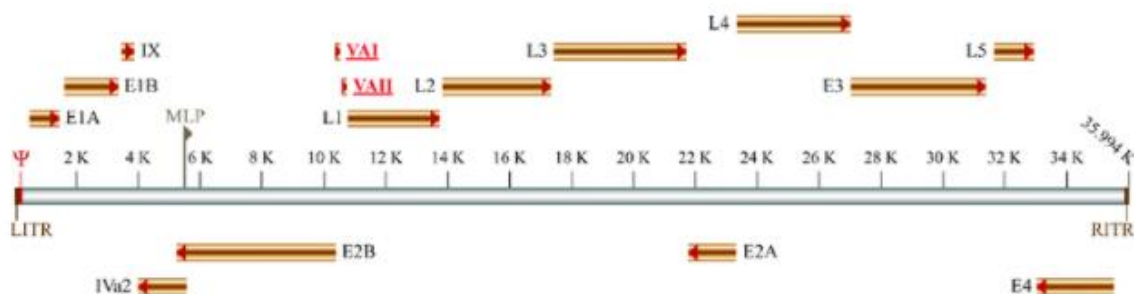


**Slika 1.** Shematski prikaz ukupne organizacije strukturnih proteina adenovirusne čestice. Popis simbola i proteina koje oni predstavljaju prikazan je ispod sheme (Preuzeto i prilagođeno iz Russell, 2009).

### 2.1.2. Genom adenovirusa

Adenovirusni genom čini linearna dvolančana DNA veličine oko 36 kb. Na 5'-krajevima je DNA kovalentno vezana s terminalnim proteinima (TP), a uz njih se nalaze obrnuta cis-djelujuća terminalna ponavljanja (engl. *inverted terminal repeats*, ITR) koja sadrže ishodišta replikacije. Geni su podjeljeni u rane i kasne, ovisno o tome transkribiraju li se prije ili nakon replikacije virusnog genoma (Russell, 2000; Charman i sur., 2019). Rani geni su E1A, E1B, E2, E3 i E4, kasni geni su L1, L2, L3, L4 i L5, a osim njih postoje i intermedijarni geni IVa2, IX, VAI, VAII (shematski prikazano na Slici 2) (Volpers i Kochanek, 2004). Prvo se transkribiraju E1A i E1B rani geni, čiji proteinski produkti aktiviraju transkripciju drugih virusnih gena odgovornih za sitezu virusne DNA. Dodatno, E1A proteini vežu se za tumor supresor Rb i tako usmjeravaju stanični ciklus domaćina u S-fazu. Uz to, ulaze i u interakcije s p53 proteinom i potiču apoptozu. U isto vrijeme proteinski produkti gena E1B, vežu se na protein p53, Bak i BAX proteine i time

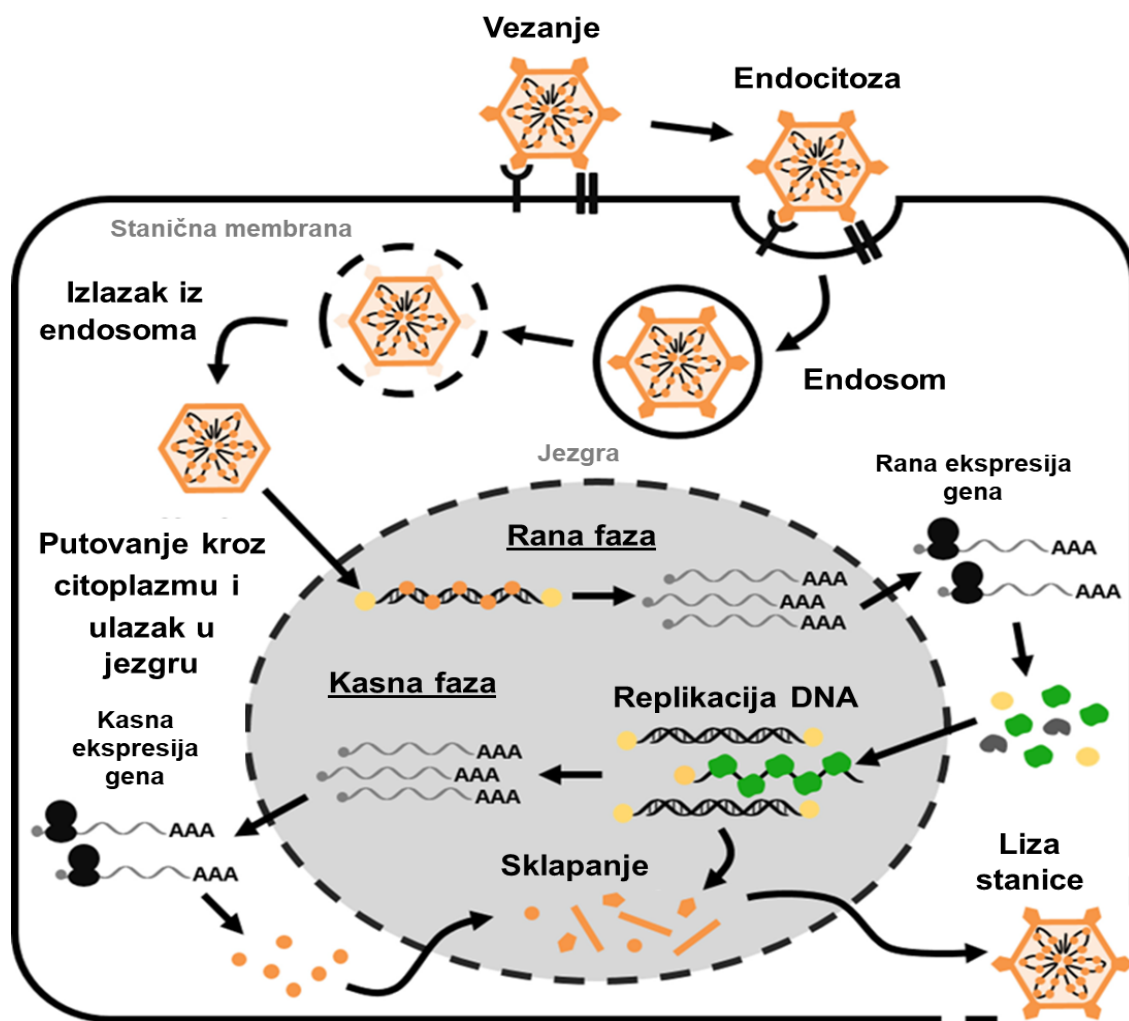
inhibiraju apoptozu stanice domaćina (Singh, 2018). Produkti E2 gena uključeni su u replikaciju virusne DNA, a produkti E3 gena imaju ulogu u regulaciji imunskog sustava domaćina. Produkti E4 gena služe za transport virusnih mRNA molekula iz jezgre u citoplazmu i istovremeno inhibiraju transport mRNA domaćina te time obustavljaju sintezu proteina domaćina. U produkte E4 gena spadaju i proteini koji induciraju apoptozu stanice s ciljem oslobađanja novosintetiziranih virusnih čestica (Saha i sur., 2014; Afkhami i sur., 2016).



**Slika 2.** Shematski prikaz genoma adenovirusa. Strelice označavaju smjer transkripcije gena. E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4 označavaju rane gene; VAI, VAII, Iva2 i IX označavaju intermedijarne gene; L1, L2, L3, L4 i L5 označavaju kasne gene. Također su prikazana obrnuta ponavljanja (LITR (engl. *left inverted terminal repeat*) i RITR (engl. *right inverted terminal repeat*) te  $\Psi$  (psi), pakirajući signal (Preuzeto iz Piedade i Azevedo-Pereira, 2017).

## 2.2. INFEKCIJA ADENOVIRUSOM

Životni ciklus adenovirusa odvija se u više koraka i shematski je prikazan na Slici 3. Započinje vezanjem adenovirusa na specifični stanični receptor što okida ulazak adenovirusa endocitozom. Endocitirani virus prolazi kroz strukturne promjene što mu omogućava oslobađanje iz endosoma, putovanje kroz citoplazmu pomoću motornih proteina i mikrotubula do jezgre te djelomično raspadanje kapside i unos virusne DNA u jezgru. Nakon toga slijedi transkripcija i translacija te replikacija adenovirusnih gena i potom sklapanje virusnih čestica. Na kraju se novosintetizirane virusne čestice oslobađaju uslijed lize stanice (Pied i Wodrich, 2019; Nemerow, 2000). U sljedećim poglavljima su faze životnog ciklusa detaljnije opisane.



**Slika 3.** Shema životnog ciklusa adenovirusa. Životni ciklus započinje vezanjem za receptor na površini stanice nakon čega slijedi endocitoza i unutarstanično putovanje koje završava unosom DNA u jezgru. Nakon transkripcije i translacije adenovirusnih gena i replikacije DNA slijedi sklapanje virusnih čestica te liza stanice i izlazak adenovirusa iz stanice (Preuzeto i prilagođeno iz Charman i sur., 2019).

### 2.2.1. Vežanje adenovirusa

Nekoliko molekula na staničnoj površini omogućuju vežanje adenovirusa: CAR (engl. *Coxsackie and Adenovirus Receptor*), molekule CD46 i CD80, dezmglein 2, sijalinska kiselina, heparan sulfat proteoglikani, integrini i MHC molekule tipa I. Navedeni receptori shematski su prikazani na Slici 4. Receptori se razlikuju po svojoj sposobnosti omogućavanja vežanja i/ili internalizacije adenovirusa (Nestić i sur., 2021; Zhang i Bergleson, 2005).



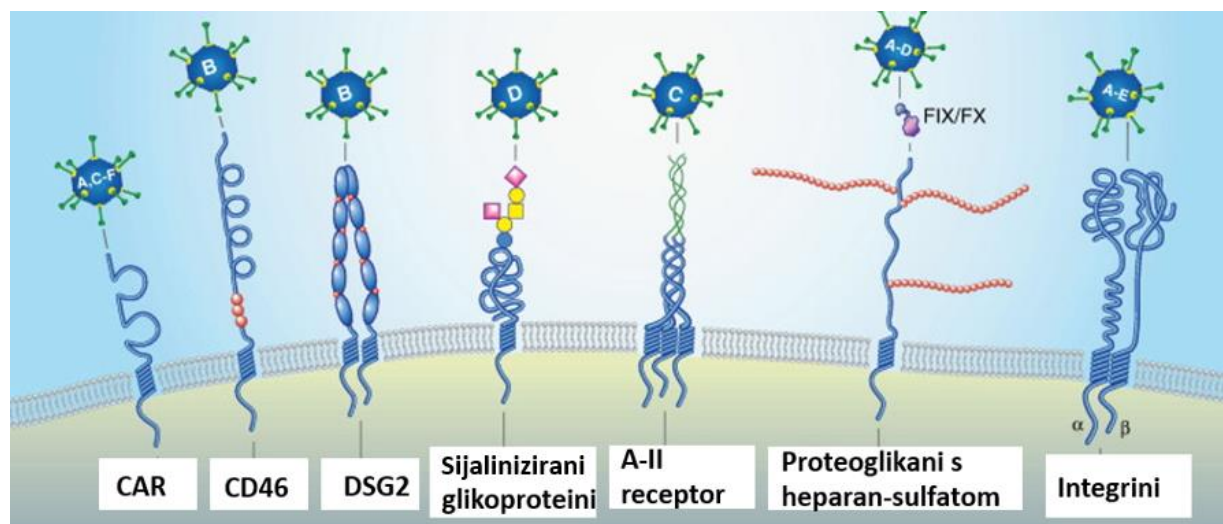
Do sad je pokazano da HAdV-D26 kao receptore može koristiti CD46, CAR, integrine i sijalinsku kiselinu (Majhen, 2022).

CD46 molekule imaju ulogu regulatora i receptora sustava komplementa te im je glavna uloga obrana zdravih stanica od degradacije aktivirane od strane komplementa. Također imaju ulogu u prezentiranju antigena i regulaciji stanične autofagije kod prisutnosti patogena u stanici. (Yamamoto i sur., 2013; Liszewski i Kemper, 2019). Do sada je pokazano da HAdV-D26 stupa u interakcije s CD46 putem glave vlakna s jako niskim afinitetom (Baker i sur., 2019) te putem interakcije s heksonom (Persson i sur., 2021).

CAR je transmembranski protein koji pripada imunoglobulinskoj superobitelji, a glavna funkcija mu je formacija čvrstih spojeva između epitelnih stanica zbog stvaranja homodimera i heterodimera između izvanstaničnih domena (Arnberg, 2009). CAR je primarni receptor za sve adenoviruse čovjeka osim podgrupe B te za mnoge adenoviruse drugih domaćina kao što su pseći adenovirusi i adenovirusi majmuna (Excoffon., 2020). Dosad je pokazano da HAdV-D26 može koristiti CAR kao receptor za vezanje, ali s puno slabijim afinitetom nego HAdV-C5 što ukazuje na mogućnost da HAdV-D26 koristi i druge receptore za vezanje. Također, kod HAdV-C5 je pokazano da CAR omogućuje vezanje HAdV-C5 na površinu stanice, ali ne i njihov ulazak, već nakon vezanja glave vlakna HAdV-C5 na CAR slijedi savijanje drška vlakna što omogućuje interakciju između integrina i arginin-glicin-aspartat (RGD) slijeda u bazi pentona (Chen i sur., 2010; Baker i sur., 2019). Za razliku od HAdV-C5, HAdV-D26 ima kraća i manje fleksibilna vlakna koja ne omogućavaju savijanje, ali ima i više isturene petlje s RGD slijedom koje omogućavaju vezanje na integrine (Leopold i Crystal, 2007; Stasiak i Stehle, 2019; Barry i sur., 2020).

Integrini su heterodimerne adhezijske molekule koje povezuju stanični citoskelet s izvanstaničnim matriksom, sudjeluju u međustaničnim interakcijama i signalnim putevima koji reguliraju procese kao što su proliferacija i diferencijacija stanica, apoptoza te migracija stanica. Osam od dvadesetčetiri poznatih heterodimera integrina prepoznaje RGD slijed (Van der Flier i Sonnenberg, 2001; Takagi, 2004; Barczyk i sur., 2009) i dosad je poznato da se svi HAdV podgrupa A-E i G vežu na integrine RGD slijedom iz baze pentona (Arnberg, 2012). Interakcija RGD slijeda i integrina aktivira njihovo nakupljanje i integrinima-posredovane signalne puteve koji rezultiraju ulaskom virusne čestice u stanicu endocitozom.  $\alpha\beta3$  integrin okarakteriziran je kao receptor za HAdV-D26 na epitelnim stanicama čovjeka (Nestić i sur., 2019).

Sijalinske kiseline su skupina šećera alfa-keto kiselina s okosnicom od devet ugljika i uobičajeno se nalaze na terminalnim dijelovima glikoproteina i glikolipida gdje imaju bitnu ulogu u staničnoj komunikaciji, ali i infekciji i preživljenju patogena koji ih koriste kao način kojim izbjegavaju imunski odgovor domaćina (Schauer, 2000; Chen i Varki, 2010; Varki, 2008). HA<sub>2</sub>-D26 se veže na sijalinske kiseline putem vodikovih i ionskih veza s aminokiselinskim ostacima smještenima u udubinama glave vlakna (Burmeister i sur., 2004; Baker i sur., 2019).



**Slika 4.** Shematski prikaz najčešćih adenovirusnih receptora. Među njima, HA<sub>2</sub>-D26 se veže s glavom vlakna i heksonom na molekulu CD46, na CAR i sijalinsku kiselinu veže se glavom vlakna, a na integrine putem RGD slijeda koji se nalazi u bazi pentona (Preuzeto i prilagođeno iz Arnberg i sur., 2012).

#### 2.2.2. Endocitoza adenovirusa

Nakon vezanja na receptor na površini stanice, dolazi do okidanja staničnih signala i ulaska adenovirusa endocitozom. Dosad je pokazano da adenovirusi u stanice mogu ući putem klatrinom posredovane endocitoze, kaveolama posredovane endocitoze, klatrinom i kaveolama neovisne endocitoze, makropinocitoze i fagocitoze (Meier i Gerber, 2004). Makropinocitoza i fagocitoza nisu okinute vezanjem virusa na specifičan receptor, već je ulazak virusa posljedica drugih staničnih procesa (Mercer i Helenius, 2009; Berclaz i sur., 2002).

Klatrinom posredovana endocitoza jedan je od najbolje okarakteriziranih puteva ulaska adenovirusa u stanicu. Nakon vezanja na receptore, dolazi do nakupljanja klatrina na

invaginacije stanične membrane što potiče formiranje klatrinom obložene vezikule. Bitnu ulogu u klatrinom posredovanoj endocitozi igra protein dinamin. Dinamin je GTPaza koja je zaslužna za odvajanje klatrinom obložene vezikule od membrane (Kaksonen i Roux, 2018; Mettlen i sur., 2018; Haucke i Kozlov, 2018). Neki od HAdV koji ulaze u stanicu klatrinom posredovanim endocitozom su HAdV-C2, HAdV-C5, HAdV-B3 i HAdV-D37 (Nestić i sur., 2021). Uloga kaveolama posredovane endocitoze i ne-klatrinske endocitoze u infekciji adenovirusom je manje poznata. Kaveolama posredovana endocitoza primijećena je kod ulaska HAdV-C5, HAdV-C2 i HAdV-D37 (Nestić i sur., 2021). Kaveole su invaginacije u obliku boca koje se formiraju i stabiliziraju pomoću proteina kaveolina 1. Kaveolinom posredovana endocitoza odvija se na hidrofobnim, lipidnim domenama membrana koje su bogate kolesterolom i sfingolipidima (Rejman i sur., 2004; Pelkmans i Helenius, 2004). Slično tome, unos neovisan o klatrinu i kaveolama može biti posredovan kolesterolnim i sfingolipidnim domenama koje se nazivaju lipidne splavi (engl. *lipid rafts*). Ovaj put ulaska primijećen je kod HAdV-C5 i HAdV-D37 (Nestić i sur., 2021; Pelkmans, 2005).

### 2.2.3. Bijeg adenovirusa iz endosoma

Oslobađanje adenovirusa iz endosoma je jedan od najbitnijih koraka infekcije adenovirusom, ali i jedan od najmanje istraženih. Izlazak iz endosoma ključan je za uspješnost infekcije jer bi u protivnom endocitirani virus završio u lizosomu gdje bi bio razgrađen. Poznato je da pucanje endosoma uslijed infekcije adenovirusom zahtijeva kiseli pH, ali endosomalni pH i prisutnost adenovirusnih čestica nisu dovoljni za pucanje endosoma, već izlazak iz endosoma ovisi o dodatnim faktorima (Maier i sur., 2012; Gastadelli i sur., 2008). Jedan od tih faktora je identificiran kao  $\alpha\beta 5$  integrin, čija je smanjena ekspresija za posljedicu imala i smanjeno oslobađanje HAdV-C5 iz endosoma (Majhen i sur., 2009). Mehanizam oslobađanja HAdV-D26 iz endosoma nije razjašnjen (Pennington i sur., 2019; Chailertvanitkul i Pouton 2010), ali je dokazano da, za razliku od HAdV-C5, HAdV-D26 u endosomu ostaje znatno duže nakon infekcije te se oslobađa tek kada endosom dosegne stadij kasnog endosoma (Tiegler i sur., 2014).

### 2.2.4. Citosolno putovanje adenovirusne čestice i unos adenovirusne DNA u jezgru

Nakon oslobađanja iz endosoma, adenovirus mora proći kroz viskozni citosol kako bi došao do jezgre, što je dosad detaljno opisano samo za HAdV-C5. Adenovirusna kapsida stupa u interakcije s mikrotubulima putem motornog proteina dineina putem direktnih interakcija s

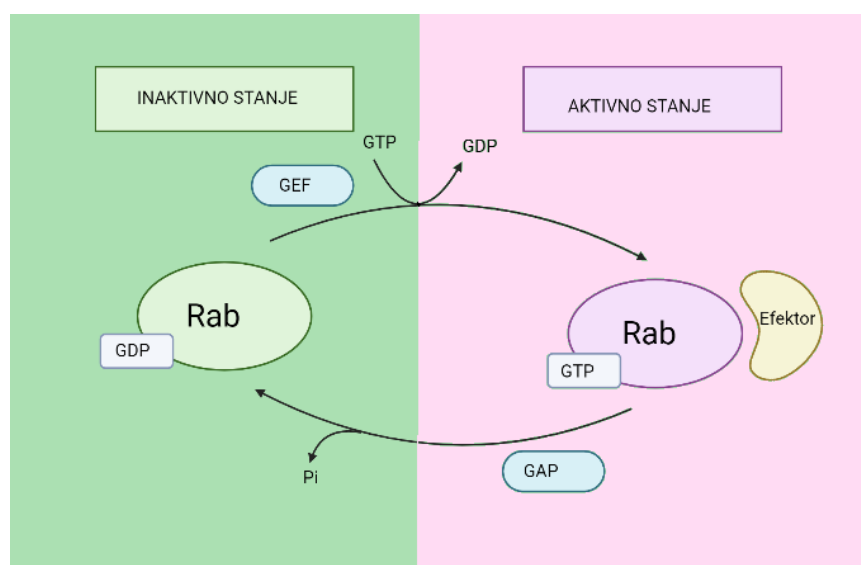
heksonom. Na taj način virus putuje do središta organizacije mikrotubula (engl. *microtubule organising center*, MTOC) koje se nalazi u blizini jezgre (Leopold i Pfister, 2006; Leopold i Crystal, 2007). Također, moguć je transport adenovirusne čestice pomoću motornog proteina kinezina, ali je rijedak (Scherer i sur., 2020). Kada se adenovirus približi jezgri odvija se proces odvajanja kapside od mikrotubula koji do sada nije okarakteriziran (Leopold i Crystal, 2007). Adenovirusna DNA u jezgru ulazi putem kompleksa jezgrine pore (engl. *nuclear pore complex*, NPC). Veličina NPC-a zahtijeva oslobađanje adenovirusne DNA od proteina kapside. Motorni protein kinezin-1 posreduje u razaranju kapside i oslabljuje integritet NPC-a te tako omogućuje ulazak adenovirusne DNA u jezgru (Greber i Flatt, 2019; Strunze i sur., 2011; Greber i sur., 1997).

### **2.3. ULOGA Rab PROTEINA U ENDOCITOZI TE UNUTARSTANIČNOM PUTOVANJU ADENOVIRUSA**

Nakon internalizacije, adenovirusi se nalaze unutar primarnih endocitnih vezikula. Endosomi se neprestano mijenjaju i sazrijevaju prelazeći iz jednog oblika u drugi što uključuje izmjenu proteina na membranama endosoma, pad pH vrijednosti unutar lumena endosoma, njihovo pomicanje u perinuklearno područje te promjenu morfologije. Dio proteina koji se izmjenjuju na membrani endosoma uključuje i obitelj Rab proteina (Spearman, 2017). Obitelj Rab proteina pripada superobitelji Ras proteina i evolucijski je očuvana što pokazuje homologija sa Sec proteinima kvasca koji imaju ulogu u formiranju vezikula sekretornog puta. Neki od Rab proteina su tkivno specifični, a neki se nalaze u svim stanicama (Kelly i sur., 2012). Rab proteini imaju niz uloga kao što su sudjelovanje u endocitozi, recikliranju endosoma i receptora, cijepanju mitohondrija i autofagiji, a veliki dio Rab proteina ima ulogu u regulaciji staničnog transporta. Rab proteini međusobno su usko povezani te zbog niza funkcija imaju ulogu kao ključni regulatori staničnog transporta i organizacije (Pereira-Leal i Seabra, 2001; Homma i sur., 2020; Brighouse i sur., 2020; Goody i sur., 2017).

Rab proteini se mogu nalaziti u aktivnom i inaktivnom obliku, a reverzibilnost procesa izmjene stanja omogućava im Rab GTPazna aktivnost. Prijelaz između aktivnog i inaktivnog oblika shematski je prikazan na Slici 5. Rab proteini se aktiviraju kada se na njih veže GTP (gvanozin-trifosfat) što im omogućuje lokalizaciju na mjestu djelovanja. Kada je na njih vezan GDP (gvanozin-difosfat) inaktivni su i nalaze se u citoplazmi. Rab-GDI, inhibitor disocijacije GDP-a (engl. *Rab GDP dissociation inhibitor*) veže se na Rab-GDP i inhibira disocijaciju GDP-a.

Kada se Rab-GDI kompleks približi ciljnom mjestu, GEF (engl. *GTP-ase exchange factor*) katalizira disocijaciju GDI-a i izmjenu GDP-a u GTP te time omogućuje aktivnom obliku, Rab-GTP-u, stabilizaciju na membrani. Aktivni Rab ulazi u interakcije s efektorima te sudjeluje u procesu endocitoze. Naime, efektori omogućuju povezivanje staničnih procesa i faza unutarstaničnog prometa aktivacijom određenih Rab proteina. Kada aktivni Rab-GTP uđe u interakciju s GAP-om (engl. *GTPase activating protein*) odvija se hidroliza GTP-a u GDP, veže se GDI i inaktivni Rab-GDP vezan u kompleksu s GDI-em vraća se u citosol (Wandigner-Ness i Zerial, 2014; Grosshanz i sur., 2006; Xu i sur., 2021).

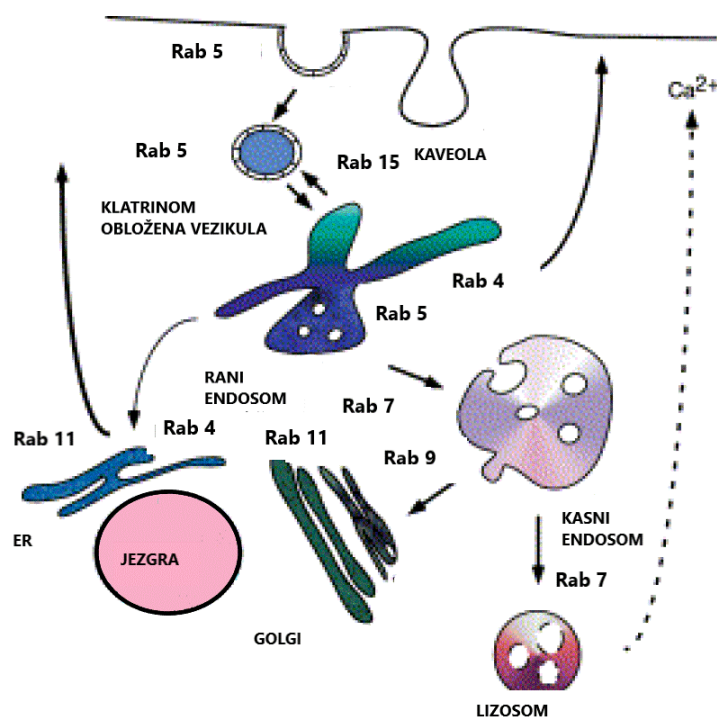


**Slika 5.** Shematski prikaz prelaska Rab proteina između aktivnog i inaktivnog stanja (Izrađeno u programu Biorender).

Endosomi se prema specifičnim proteinskim biljezima (uključujući Rab proteine), pH vrijednosti unutar lumena endosoma te ulozi u unutarstaničnom transportu mogu podijeliti na rane endosome (engl. *early endosomes*), reciklirajuće endosome (engl. *recycling endosomes*), sazrijevajuće endosome (engl. *maturing endosomes*), kasne endosome (engl. *late endosomes*), lizosome i egzosome. Rane endosome obilježava prisutnost Rab5, dok kasne endosome Rab7 i Rab9 (Lindsay i sur., 2002). Sazrijevajući endosomi kao prijelazni oblik između ranih i kasnih endosoma sadrže i Rab5 i Rab7 proteine (Tiegler i sur., 2014; Houtari i Helenius, 2011). Protein Rab11 sudjeluje u recikliranju receptora natrag na staničnu površinu te se smatra markerom reciklirajućih endosoma (Zulkefli i sur., 2019; Mercer i sur., 2010). U svom inaktivnom stanju Rab11 je lokaliziran u endoplazmatskom retikulumu. Disocirani ligandi ostaju u ranim endosomima koje protein Rab11 usmjerava prema mikrotubulima (Ferro i sur., 2021; Amorim i

sur. 2011). Zakiseljavanje endosoma je regulirano i važno za sazrijevanje endosoma (Wilcke i sur., 2000). Lokalizacija Rab proteina tijekom endocitoze prikazana je na Slici 6.

Nakon uspješne internalizacije endocitozom, adenovirusi nastavljaju svoje putovanje do jezgre u endosomima. Jedina studija koja opisuje unutarstanično putovanje HAdV-D26 pokazuje da se HAdV-D26 u epitelnim stanicama A549 nakuplja u kasnim endosomima (Tiegler i sur., 2014). Nekoliko istraživanja opisuje unutarstanično putovanje drugih tipova HAdV: HAdV-B35 se kao i HAdV-D26 nakuplja u kasnim endosomima A549 stanične linije, HAdV-B7 se nakuplja u lizosomima (Myazawa i sur.,2001), dok HAdV-C2 i -C5 izlaze iz ranih endosoma koji su pozitivni na rani endosomalni antigen 1 (engl. *Early Endosomal Antigen 1*, EEA1) koji ima ulogu efektora Rab5 proteina. Temperaturno senzitivni mutant HAdV-C2, Ad2-ts1, koji ne pakira viralnu proteazu odgovornu za bijeg iz endosoma putuje i kroz rane i kroz kasne endosome (Gastadelli i sur., 2008). Infekcija s HAdV-D37 bila je uspješna u stanicama koje nisu imale funkcionalan EEA1 što je pokazalo da stanično putovanje HAdV-D37 ne ovisi o prisutnosti Rab proteina (Lee i sur., 2020). U slučaju HAdV-G41 pokazano je da se nakon ulaska u stanicu zadržava blizu površine stanične membrane i u vezikulama (Leung i Brown, 2011).



**Slika 6.** Shematski prikaz Rab-posredovanog endocitoznog puta (Preuzeto i prilagođeno iz Stein i sur., 2003)

## 2.4. ZNAČAJ

Razumijevanje uloge Rab proteina i njihovog posredovanja u unutarstaničnom transportu omogućava pojašnjavanje mehanizama biologije adenovirusa, adenovirusne infekcije i endocitoze kao procesa. Adenovirusi imaju široku uporabu u vakcinama i genskoj terapiji te je dodatno razumijevanje puta ulaska u stanicu i interakcije adenovirusa sa staničnim proteinima nužno za unaprjeđenje primjene adenovirusa u medicinske svrhe. Svi stadiji životnog ciklusa adenovirusa ovise o endocitozi i putovanju adenovirusa kroz stanicu. Endocitoza može promijeniti ekspresiju adenovirusnih receptora ili utjecati na njihovo recikliranje, što može promijeniti njihovu dostupnost na površini stanice. Također, različiti putevi endocitoze mogu promijeniti internalizaciju adenovirusa što može utjecati na ekspresiju transgena i potaknuti različit imunski odgovor domaćina. To u nekim slučajevima može biti nepoželjno, ali u drugim slučajevima može biti korisno. Bez obzira na činjenicu što se adenovirusi ne smatraju jako opasnim, infekcija adenovirusima uzrokuje značajnu smrtnost kod imunokompromitiranih osoba, stoga razumijevanje mehanizama infekcije može doprinijeti razvoju novih antivirusnih lijekova za liječenje takvih pacijenata (Nestić i sur., 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

**Tablica 1.** Popis korištenih kemikalija

Naziv	Proizvođač
Medij za uklapanje <i>DAPI Fluoromount G</i> (DAPI: 4',6-diamidin-2-fenilindol)	Southern Biotech, SAD
Dimetil sulfoksid, DMSO (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Gram Mol, Hrvatska
Dulbeccova modifikacija fosfatnog pufera bez Ca <sup>2+</sup> i Mg <sup>2+</sup> (DPBS)	Sigma-Aldrich, SAD
Dulbeccova modifikacija Eaglovog hranjivog medija (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , DMEM)	Lonza, Švicarska
Serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Sigma-Aldrich, SAD
Etanol	Gram Mol, Hrvatska
Glicerol	Kemika, Hrvatska
Albumin iz seruma goveda (engl. <i>Bovine Serum Albumine</i> , BSA)	Macherey-Nagel, Njemačka
Lipofektamin 2000	Invitrogen, SAD
Optimem	Gibco, SAD
Paraformaldehid, PFA 4 %	Sigma-Aldrich, SAD
Triton X-100	Sigma-Aldrich, SAD
Virocid 1 %	Genera, Hrvatska
Tripsin	Sigma-Aldrich, Njemačka
Orange G boja	Merck, Njemačka
rCutSmart™ Buffer	New England Biolabs, SAD
Standard za elektroforezu (engl. <i>1 kb DNA Ladder</i> )	New England Biolabs, SAD
Agaroz	Sigma-Aldrich, Njemačka
Midori zelena boja (engl. <i>Midori green advanced DNA stain</i> )	Düren, Njemačka
Tekućina za protočnu citometriju <i>IsoFlow Sheat Fluid</i>	Beckman Coulter, SAD



**Tablica 2.** Priprema otopina i pufera

Naziv	Priprema
Otopina CsCl gustoće 1,25 g mL <sup>-1</sup>	36,16 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Otopina CsCl gustoće 1,34 g mL <sup>-1</sup>	51,20 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Otopina CsCl gustoće 1,40 g mL <sup>-1</sup>	62,00 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Pufer TAE (50x)	242 g Tris baza, 57,1 mL ledene octene kiseline, 100 mL 0,5 M, pH 8.0, otopiti u 1 L diH <sub>2</sub> O (deionizirana voda)
Pufer TD	8 g NaCl i 0,38 g KCl otopi se u 150 mL diH <sub>2</sub> O, doda se 0,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH <sub>2</sub> O, podese se pH 7,4-7,5; nadopuni se do 1 L s diH <sub>2</sub> O;
Sterilni fosfatni pufer (PBS)	2 g 2,7 mM KCl; 0,2 g 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,0 g 137 mM NaCl; 1,15 g 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> u 1000 mL deH <sub>2</sub> O (destilirana voda)
Medij za uzgoj stanica DMEM-FBS <sub>10%</sub>	500 mL FBS u 4950 mL DMEM
0,1 % TritonX-100/PBS	1 mL 1x TritonX-100 dodaje se 9 mL PBS
3 % BSA/PBS	0,3 g BSA otopi se u 10 mL PBS
5 % BSA/PBS	0,5 g BSA otopi se u 10 mL PBS
4 % PFA/PBS	dodati 4 g paraformaldehida i 1 mL 1 M NaOH u 50 mL deH <sub>2</sub> O. Lagano miješati uz zagrijavanje do ~60 °C. Dodati 10 mL 10X PBS-a i ostaviti da se smjesa ohladi na sobnu temperaturu.
2 % PFA/PBS	Pomiješati jednake količine 4 % PFA/PBS i PBS
1 % PFA/PBS	Pomiješati 4 % PFA/PBS s 3x većim volumenom PBS-a

**Tablica 3.** Popis korištenih enzima

Naziv	Proizvođač
SacI-HF™ (engl. <i>SacI High Fidelity</i> )	New England Biolabs, SAD
BamHI-HF™ (engl. <i>BamHI High Fidelity</i> )	New England Biolabs, SAD
SalI HF™ (engl. <i>SalI High Fidelity</i> )	New England Biolabs, SAD
PstI HF™ (engl. <i>PstI High Fidelity</i> )	New England Biolabs, SAD

**Tablica 4.** Popis korištenih protutijela

Specifičnost	Proizvedeno u organizmu	Koncentracija	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
<b>Primarna protutijela</b>					
Rab5	zec	1 mg/mL	1:50	CellSignaling Technology, SAD	3547
Rab7	zec	1 mg/mL	1:50	CellSignaling Technology, SAD	9367
Rab9	zec	1 mg/mL	1:50	CellSignaling Technology, SAD	5118
Rab11	zec	1 mg/mL	1:50	CellSignaling Technology, SAD	5589
<b>Sekundarno protutijelo</b>					
protu-zec IgG obilježeno s Alexa Fluor 647	koza	2 mg/mL	1:1000	CellSignaling Technology, SAD	44145

### 3.1.2. Stanične linije

U ovom radu korištene su komercijalno dostupne adherentne stanice adenokarcinoma pluća čovjeka (engl. *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*, A549, ATCC<sup>®</sup> CCL-185) te klon HEK-293-K1 koji je prethodno konstruiran u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala (neobjavljeni rezultati). Ukratko, stanična linija bubrega embrija čovjeka (engl. *human embryonic kidney*, HEK-293, ATCC<sup>®</sup> CRL-1573) korištena je za transfekciju s plazmidom pcDNA  $\beta 3$  (dobiven ljubaznošću dr. sc. E. H. Danen sa Sveučilišta u Leidenu, Nizozemska) koji sadrži gen za  $\beta 3$  podjedinicu integrina i gen za otpornost na geneticin te je izdvojen stabilno transficirani klon stanica HEK-293-K1 sa stabilno povećanom površinskom ekspresijom  $\alpha\beta 3$  integrina.

### 3.1.3. Replikacijski defektan adenovirusni vektor

U ovom radu korišten je replikacijski defektan adenovirusni vektor temeljen na adenovirusu tipa 26 (HAdV-D26) i kao transgen sadrži zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP) pod promotorom citomegalovirusa čovjeka (engl. *cytomegalovirus*, CMV). Korišteni vektor prethodno je konstruiran i opisan (Abbink i sur., 2007).

### 3.1.4. Plazmidi

Plazmidi korišteni u izradi ovog diplomskog rada dobiveni su ljubaznošću dr. Richarda Pagana (opisano u Sharma i sur., 2003). Korišteni plazmidi (Tablica 5) kao okosnicu sadrže plazmid pDsRed-C1, koji kao fuzijski protein u istom okviru čitanja sadrže DsRed1 i pojedini Rab protein. pDsRed-C1 plazmid sadrži CMV promotor, Kozak sekvencu, HA biljeg, gene za rezistenciju na kanamicin (KanR) i neomicin (NeoR) te dva ishodišta replikacije (AddGene Vector Database). CMV promotor okarakteriziran je kao snažni promotor i često se koristi kako bi se postigla visoka produkcija rekombinantnih proteina sisavaca (Xu i sur., 2004). Kozak sekvenca je nukleotidni slijed koji ima ulogu mjesta inicijacije translacije u većini eukariotskih mRNA (eng. *messenger RNA*) transkripata (Acevedo i sur., 2018). HA-biljeg (engl. *Human influenza hemagglutinin*) je sekvenca koja kodira za površinski glikoprotein potreban za infektivnost virusa gripe čovjeka, a koristi se kao epitopna oznaka koja omogućuje detekciju i pročišćavanje označenih proteina (Li, 2010). Inerti koji kodiraju za Rab5 ,7, 9, i 11 WT i DN verzije proteina ubačeni su u pDsRed-C1 plazmid između MCS (engl. *multiple cloning site*) i

poli-A sekvence (SV40 poly(A) signal).

**Tablica 5.** Popis korištenih plazmida

<b>Plazmid</b>	<b>Addgene referentni broj</b>
DsRed-Rab5 WT	13050
DsRed-Rab5 DN	13051
DsRed-Rab7 WT	12661
DsRed-Rab7 DN	12662
DsRed-Rab9 WT	12677
DsRed-Rab9 DN	12676
DsRed-Rab11 WT	12679
DsRed-Rab11 DN	12680

### 3.1.5. Uređaji i pomagala

**Tablica 6.** Popis korištenih uređaja i pomagala

<b>Naziv</b>	<b>Proizvođač</b>
Komorica za brojanje stanica	Uppsala, Švicarska
Centrifuga do 50 mL	Heraeus, Njemačka
Mikroskop EVOS Flouid Cell Imaging	Thermo Scientific, SAD
Igla za pročišćavanje virusa	Merck, Švicarska
Inkubator za uzgoj stanica	Thermo Scientific, SAD
Invertni svjetlosni mikroskop	Opton, Njemačka
Kabinet za sterilan rad	Klimaoprema, Hrvatska
Konfokalni mikroskop (Leica SP8 X FLIM)	Leica, Njemačka
Mikrovalna pećnica	Končar, Hrvatska
Nanodrop	Thermo Scientific, SAD
Petrijevke promjera 10 cm	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj stanica s 12 i 24 bunarića (engl. <i>Multi-Well plate 12/24</i> )	Falcon Becton Dickinson, SAD
Protočni citometar FACSCalibur	Becton Dickinson, SAD

Stakalca za konfokalni mikroskop	Vitrognost, Hrvatska
Stolna centrifuga	Eppendorf, Njemačka
Termoblok	Eppendorf, Njemačka
Transiluminator	Vilber Lourmat, Njemačka
Ultracentrifuga	Beckman, SAD
Uređaj za horizontalnu gel-elektroforezu	Bio-rad, SAD
ChemiDoc XRS+ iMAGER	Bio-rad, SAD
Vaga	Tehtnica, Slovenija
Vaga (analitička)	Mettler Toledo, Švicarska
Vodena kupelj	Tehtnica, Slovenija
Vorteks	Tehtnica, Slovenija
Spremnik za tekući dušik 35VHC	Taylor-Wharton, SAD
Termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
Mikroepuvete	Eppendorf, Njemačka
Nastavci za mikropipete s filtrom i bez filtra	Eppendorf, Njemačka
Epruvete za centrifugiranje Ultra-Clear 344059	Beckman, SAD
Ampule za smrzavanje stanica	Nunc, Danska

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice se uzgajaju u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm u inkubatoru za uzgoj stanica koji održava konstantnu temperaturu pri 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub> u smjesi zraka te je atmosfera zasićena vlagom. Stanice su uzgajane u mediju za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>. Stanice su adherentne što znači da rastu privršćene na dnu Petrijeve zdjelice sve dok ne prerastu dostupnu površinu ili iscrpe tvari potrebne za rast. Prije nego se to dogodi potrebno ih je presaditi u novu Petrijevu zdjelicu sa svježim medijem. Prvo se uklanja medij i stanice se ispiru dva puta s 1 mL sterilnog DPBS pufera. Nakon toga dodaje se 1 mL tripsina zagrijanog pri 37 °C. Tripsin je proteolitički enzim koji odvaja stanice od površine Petrijevih zdjelica. Djelovanje tripsina povremeno se prati korištenjem invertnog svjetlosnog mikroskopa. Kada su stanice odignute i zaokružene dodaje se 9 mL medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub> pri čemu serum inhibira djelovanje tripsina.

Resuspendiranim stanicama odredi se koncentracija korištenjem komorica za brojanje stanica i zatim se željeni broj stanica nasadi u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm uz dodatak svježeg medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub> do ukupnog volumena od 10 mL.

Za potrebe pokusa A549 stanice su nasadivane i u pločice za uzgoj stanica s 12 bunarića u količini  $1.25 \cdot 10^5$  stanica po bunariću i na stakalca koja su se nalazila u pločici za uzgoj stanica u količini od  $5 \cdot 10^4$  stanica po bunariću.

### 3.2.2. Odmrzavanje i zamrzavanje stanica

Stanice se čuvaju u zamrznutom obliku u ampulama koje su smještene u spremniku s tekućim dušikom. Odmrzavanje se provodi uranjanjem ampule u kupelj zagrijanu pri 37 °C te resuspendiranjem u 10 mL medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>. Nakon toga stanice se nasaduju u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm i uzgajaju se u inkubatoru. Postupak zamrzavanja započinje tripsinizacijom kako je to opisano u prethodnom poglavlju. Stanična suspenzija se centrifugira 10 minuta pri 1100 x g. Talog stanica se resuspendira s 1 mL medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub> koji sadrži DMSO (5 % volumnog udjela) te se takva suspenzija premješta u ampulu za smrzavanje. Ampula sa staničnom suspenzijom inkubira se na ledu 30 minuta, a nakon toga 24 sata u parama tekućeg dušika čemu slijedi spremanje u tekući dušik.

### 3.2.3. Transfekcija stanica

Transfekcija je metoda unosa strane DNA u eukariotske stanice. Metoda transfekcije pomoću transfekcijskog reagensa lipofektamina temelji se na interakciji pozitivno nabijenih lipopleksa s negativno nabijenom DNA čime se formiraju liposomi, kompleksi koji sličje micelama. Pozitivni površinski naboj liposoma posreduje u interakciji nukleinske kiseline i stanične membrane, omogućujući fuziju transfekcijskog kompleksa liposom/nukleinska kiselina s negativno nabijenom staničnom membranom. Smatra se da transfekcijski kompleks ulazi u stanicu i putem endocitoze (Cardarelli i sur., 2016). Za transfekciju su korištene dvije otopine, A i B, podjednakog volumena. Otopina A je smjesa plazmida i OptiMEM-a, a otopina B je smjesa Lipofectamine-a 2000 i OptiMEM-a. Miješanjem otopina A i B dobije se transfekcijska smjesa koja se inkubira 5 minuta nakon čega se nakapava na stanice u kojima se prethodno nalazi određena količina medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>. Volumen transfekcijske smjese ovisi o formatu pločice za uzgoj stanica koja se koristi. U slučaju pločice za uzgoj stanica s 12 bunarića ukupni volumen transfekcijske smjese jest 200 µL i ona se nakapava na stanice koje se

prethodno nalaze u 800  $\mu$ L medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>. U slučaju pločice za uzgoj stanica s 24 bunarića, ukupni volumen transfekcijske smjese iznosi 100  $\mu$ L, a nakapava se na stanice na stakalcima koje se prethodno nalaze u 400  $\mu$ L medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>. Nakon 8 sati inkubacije stanica s transfekcijskom smjesom, ukupni medij iznad stanica se miče i dodaje se svježi medij za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>, a stanice se inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanica 48 sati. Kako korišteni plazmidi sadrže gen koji kodira za crveni fluorescentni protein DsRed1, uspješnost transfekcije praćena je protočnom citometrijom (za uzorke stanica u formatu pločica za uzgoj stanica s 12 bunarića) ili konfokalnom mikroskopijom (za uzorke stanica na stakalcima u formatu pločica za uzgoj stanica s 24 bunarića). Nakon određivanja optimalnih uvjeta transfekcije, isti su primjenjeni u svim naknadnim pokusima transfekcije s plazmidima opisanima u Tablici 5.

#### 3.2.4. Transdukcija

Stanice su transducirane s HAdV-D26 opisanom u poglavlju 3.1.3. Transdukcija je provedena 24 sata nakon transfekcije s plazmidima. Prije same transdukcije potrebno je izbrojati stanice kako bi se mogao dodati volumen virusa u skladu sa zadanim MOI-em (engl. *multiplicity of infection*). MOI broj opisuje broj virusnih čestica po stanici. Nakon brojanja stanica priprema se virusno razrjeđenje koje se sastoji od MOI-em određenog volumena virusa i medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub> zagrijanog pri 37 °C do ukupnog volumena 500  $\mu$ L (za uzorke stanica u formatu pločica za uzgoj stanica s 12 bunarića) ili 300  $\mu$ L (za uzorke stanica na stakalcima u formatu pločica za uzgoj stanica s 24 bunarića). Sa stanica se miče medij i dodaje se virusno razrjeđenje nakon čega slijedi inkubacija 2 sata u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, a potom su virusi isprani sa stanica i dodan je svježi medij za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>, a uzorci vraćeni u inkubator za uzgoj stanica. MOI za stanice uzgojene u pločici za uzgoj stanica s 12 bunarića iznosio je  $2 \cdot 10^4$  virusnih čestica po stanici, a za stanice uzgojene na stakalcima u pločici za uzgoj stanica s 12 bunarića iznosio je  $1 \cdot 10^5$  virusnih čestica po stanici. Uspješna transdukcija virusom mjerena je ekspresijom GFP-a, čiji intenzitet fluorescencije je nakon pobuđivanja valnom duljinom 488 nm detektiran konfokalnom mikroskopijom ili protočnom citometrijom.

### 3.2.5. Imunofluorescencija

Za određivanje unutarstaničnog signala transgenih i staničnih Rab proteina korištena je imunofluorescencija. Korištene su netransficirane stanice za određivanje signala endogenih Rab proteina te transficirane stanice za određivanje signala transgenih Rab proteina (WT ili DN; 48 sati nakon transfekcije). Stanice uzgojene na stakalcima u pločici za uzgoj stanica s 24 bunarića su dva puta isprane s PBS-om i fiksirane s 2 % PFA/PBS 12 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga netransficirane stanice su dva puta isprane s PBS-om i inkubirane u 0,1 % TritonX-100/PBS 2 minute na sobnoj temperaturi kako bi se permeabilizirale, tj. kako bi se korištenjem detergenta napravile pore u staničnoj membrani koje osiguravaju ulazak protutijela u stanicu. Zatim je potrebno dva puta isprati stanice u PBS-u i blokirati stanice s 3 % BSA/PBS 30 minuta kako bi se smanjilo nespecifično vezanje protutijela. Slijedi inkubacija u 5 % BSA/PBS koja sadrži primarna protutijela. Primarna protutijela su specifična za svaki tip Rab proteina i opisana su u Tablici 4. Inkubacija je trajala sat vremena nakon čega je slijedilo dvostruko ispiranje u PBS-u i inkubacija sat vremena u 5 % BSA/PBS koja je sadržavala sekundarno protutijelo. Sekundarno protutijelo veže se za primarno i obilježeno je s fluorescentnom bojom Alexa Fluor 647 (AF647). Nakon inkubacije u sekundarnom protutijelu slijedi ispiranje u PBS-u i  $mqH_2O$  te uklapanje na predmetna stakalca pomoću medija za uklapanje koji sadrži DAPI. DAPI je molekula koja se veže za AT-bogate regije u staničnoj dvolančanoj DNA i na taj način omogućuje vizualizaciju jezgre u uzorku. S obzirom na fluorescentna svojstva konfokalnom mikroskopijom su praćeni signali jezgre (DAPI;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 405 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 410\text{-}480 \text{ nm}$ ), uspješnost transdukcije (GFP;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 498\text{-}540 \text{ nm}$ ), uspješnost transfekcije (DsRed1;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 558 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 568\text{-}610 \text{ nm}$ ) i signal endogenog Rab proteina (AF647;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 647 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 657\text{-}690 \text{ nm}$ ). Pri valnoj duljini od 615 nm su uzorci također snimani u tehnici refleksije (engl. *Reflection Interference Contrast Microscopy*; RICM) kako bi se dobili obrisi stanica. Ovako pripremljeni uzorci vizualizirani su pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 X FLIM (Leica Microsystems, Njemačka) koristeći HC PL APO CS2 63 $\times$ /1.40 objektiv, a analizirani pomoću programa Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Njemačka) i ImageJ.

### 3.2.6. Određivanje uspješnosti transfekcije i transdukcije protočnom citometrijom

Stanice uzgojene u pločici za uzgoj stanica s 24 bunarića su 24 sata nakon transdukcije



tripsinizirane i resuspendirane u 400  $\mu$ L medija nakon čega su centrifugirane pri 1200 x g 5 minuta. Isprane su s PBS-om i ponovno centrifugirane pri 1200 x g 5 minuta. Stanični talog je fiksiran sa 100  $\mu$ L 1 % PFA/PBS i stanice se inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom se stanice ispiru dva puta s PBS-om ( do 500  $\mu$ L) uz centrifugiranje pri 1200 x g 5 minuta. Na kraju se talog stanica resuspendira u 400  $\mu$ L PBS-a nakon čega se uzorci analiziraju protočnom citometrijom na uređaju FACSCalibur. Protočna citometrija je metoda za analizu fizikalno-kemijskih svojstava stanica. Temelji se na protoku stanica u fluidu gdje jedna po jedna stanica prolaze kroz snop laserskih zraka koje se lome ovisno o svojstvima stanica. Stanice su najčešće obilježene određenim fluorescentim markerima koji absorbiraju svjetlost popraćenu emisijom svjetlosti pri određenoj valnoj duljini. U ovom slučaju nakon pobude stanica laserskim zrakama korišteni su FL1 i FL2 detektori protočnog citometra koji detektiraju emisiju valnih duljina zelene boje proizašle iz virusom kodiranog GFP-a (FL1) i crvene boje proizašle iz plazmidom kodiranog DsRed1 proteina (FL2). Pozitivan fluorescentni signal detektiran pomoću FL1 indikator je uspješne transdukcije adenoviralnim vektorom, dok je pozitivan fluorescentni signal detektiran pomoću FL2 indikator uspješne transfekcije plazmidom. Podaci dobiveni analizom pomoću protočne citometrije obrađeni su u programu FCS Express.

### 3.2.7. Određivanje uspješnosti transfekcije i transdukcije konfokalnom mikroskopijom

Konfokalna laserska pretražna mikroskopija (engl. *confocal laser scanning microscopy*) korištena je za analizu transduciranih i transficiranih stanica. Stanice uzgojene na stakalcima u pločicama za uzgoj stanica s 24 bunarića se 24 sata nakon transdukcije dva puta ispiru s PBS-om, fiksiraju s 200  $\mu$ L 2 %-tne PFA/PBS i inkubiraju 12 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega slijedi ispiranje u PBS-u i mqH<sub>2</sub>O te uklapanje na predmetna stakalca uz pomoć sredstva za uklapanje koje sadrži DAPI. DAPI je molekula koja se veže za AT-bogate regije u staničnoj dvolančanoj DNA i na taj način omogućuje vizualizaciju jezgre u uzorku. S obzirom na fluorescentna svojstva konfokalnom mikroskopijom su praćeni signali jezgre (DAPI;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 405$  nm;  $\lambda_{\text{emisija}} = 410-480$  nm), uspješnost transdukcije (GFP;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 488$  nm;  $\lambda_{\text{emisija}} = 498-540$  nm) i uspješnost transfekcije (DsRed1;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 558$  nm;  $\lambda_{\text{emisija}} = 568-610$  nm). Pri valnoj duljini od 615 nm su uzorci također snimani u tehnici refleksije (engl. *Reflection Interference Contrast Microscopy*; RICM) kako bi se dobili obrisi stanica. Uzorci su vizualizirani pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 X FLIM (LeicaMicrosystems, Njemačka) koristeći HC

PL APO CS2 63×/1.40 objektiv, a analizirani pomoću programa Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Njemačka) i ImageJ. Za svaki uzorak je snimano više vidnih polja.

### 3.2.8. Restriksijska analiza plazmida i gel elektroforeza

Prije same transfekcije potrebno je analizirati plazmide restriksijskom analizom kako bi se potvrdio identitet plazmida, tj. provjerilo da tijekom umnožavanja i izolacije plazmida nije došlo do promjena u DNA slijedu. Na temelju mapa plazmida vizualiziranih pomoću programa SnapGene odabrani su restriksijski enzimi kojima je omogućeno lineariziranje ili fragmentiranje plazmida. Cijepanje plazmida provedeno je prema uputama proizvođača restriksijskih enzima. Za restriksijsku smjesu korišteno je 500 ng plazmidne DNA, 2,5 µL 10x koncentriranog pufera u kojem enzim optimalno djeluje, 1 µL restriksijskog enzima i do ukupnog volumena od 25 µL dodana je voda bez nukleaza (AccuGene). Uzorci su inkubirani preko noći pri 37 °C. Nepocijepani i cijepani plazmidi razdvojeni su pomoću gel elektroforeze u 0,8 % agaroznom gelu koji je pripremljen u 1x TAE puferu (pripremljen u sterilnoj destiliranoj vodi). Agarozna se otapa zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici uzastopnim ponavljanjima grijanja do vrenja i hlađenja uz miješanje do potpunog otapanja agaroze, nakon čega se hladi do približno 40°C i uz dodatak 2 µL MidoriGreen, boje koja omogućava vizualizaciju uzoraka na gelu pod UV zrakama, izlijeva u prethodno pripremljeni kalup s češljicom za gel-elektroforezu. Nakon skrtnjavanja, 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. Od pojedinog nepocijepanog i cijepanog plazmida 10 µL je uz dodatak 2 µL OrangeG boje koja omogućuje vizualizaciju tijekom elektroforeze jer putuje kroz gel jednakom brzinom kao fragmenti DNA veličine 50 parova baza, nanoseno na gel i razdvojeno u uređaju za gel-elektroforezu (BioRad, SAD). Kako bi se procijenila veličina fragmenata i lineariziranih plazmida korišten je standard za elektroforezu koji je smjesa odsječaka DNA poznatih veličina. Elektroforeza u agaroznom gelu se provodi pri 50 V tijekom približno 60 minuta. Agarozni gel je nakon završetka gel-elektroforeze fotografiran korištenjem uređaja ChemiDoc XRS+ iMAGER. Dobiveni rezultati uspoređeni su sa simulacijom gela u programu SnapGene.

### 3.2.9. Analiza Rab WT i Rab DN gena u programu CLC sequence viewer i NCBI-Blast-u

Iako su plazmidi prethodno konstruirani, provedeno je pretraživanje i poravnanje DNA slijedova

gena divljih tipova Rab proteina dobivenih iz mapa plazmida u programu SnapGene s bazom podataka NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) pomoću alata NCBI DNA Blast. Korištenjem programa CLC Sequence Viewer uspoređen je slijed aminokiselina između Rab proteina divljeg tipa i pripadajućih dominantno negativnih verzija Rab proteina.

### 3.2.10. Umnažanje i pročišćavanje virusa centrifugiranjem u cezijevom kloridu

Za umnažanje HAdV-D26 korištene su HEK-293-K1 stanice. Pošto su virusi replikacijski defektni uslijed delecije u E1 području genoma, za njihovu replikaciju potrebne su stanice koje komplementiraju deletirane gene virusa. U ovom slučaju, HEK-293-K1 stanice imaju stabilno eksprimirane E1 gene koji su potrebni za virusnu replikaciju. Da bi se osigurala dovoljna količina virusa za pročišćavanje, prethodno je u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala pripremljen supernatant infekcije dobiven infekcijom 5 Petrijevih zdjelica od 10 cm HEK-293-K1 stanica s HAdV-D26 uz MOI 5 infektivnih čestica pročišćenog virusa po stanici, gdje su stanice uzgajane do potpunog citopatogenog učinka (CPU) i nakon ciklusa smrzavanja i odmrzavanja je skupljen samo supernatant infekcije, dok je stanični debri uklonjen centrifugiranjem. Tako pripremljen supernatant infekcije je izrazito bogat viralnim česticama, ali je njihova koncentracija nepoznata. Tri Petrijeve zdjelice od 10 cm s konfluentnim HEK-293-K1 stanicama su inficirane s 10, 50 ili 250  $\mu\text{L}$  supernatanta infekcije. Infekcija stanica praćena je pomoću mikroskopa EVOS Flouid Cell Imaging kroz tri dana do pojave potpunog CPU. Iskustveno je određeno da je idealna količina supernatanta infekcije 30  $\mu\text{L}$  da bi se treći dan postigao CPU. Stoga je za umnažanje HAdV-D26 uzgojeno 60 konfluentnih Petrijevih zdjelica od 10 cm s HEK-293-K1 stanicama koje su inficirane s 30  $\mu\text{L}$  supernatanta infekcije. Inficirane stanice uzgajaju se u inkubatoru do pojave CPU treći dan nakon infekcije. Stanice se odvajaju od podloge pipetiranjem te zajedno s medijem za uzgoj stanica skupe u epruvete i centrifugiraju pri 1100 x g 10 minuta. Talozi iz svih 60 Petrijevih zdjelica se skupe i resuspendiraju u 10 mL medija za uzgoj stanica DMEM-FBS<sub>10%</sub>. Uzorak se u 3 ciklusa zamrzava (etanol u suhom ledu) i odmrzava (37 °C) kako bi se virusi oslobodili iz stanica. Centrifugiranjem tijekom 10 minuta pri 3600 x g odvajaju se grubi raspadnuti ostaci stanica. Supernatant se sačuva te se iz njega pročiste adenovirusi metodom ultracentrifugiranja u CsCl. U epruvete za centrifugiranje prvo se dodaje 2,4 mL CsCl gustoće 1,4 g/mL i na njega se polako nakapava 2,4 mL CsCl gustoće 1,25 g/mL. Na taj sloj nakapava se sačuvani supernatant koji

sadrži viruse i potom se do vrha dodaje sterilni PBS. Uzorci se centrifugiraju u Beckman ultracentrifugi 1 sat i 30 minuta pri 20 °C i 60000 x g. Nakon centrifugiranja vidljiv je bijeli sloj na granici između otopina CsCl različitih gustoća. Iznad sloja virusa nalazi se drugi, manje intenzivni bijeli sloj u kojem se nalaze prazne kapside. Bijeli sloj virusa se pomoću šprice i igle pokupi iz epruvete za centrifugiranje u maksimalnom volumenu od 1,5 mL i dodaje se u novu epruvetu za centrifugiranje i miješa se s CsCl gustoće 1,34 g/mL do vrha epruvete za centrifugiranje. Slijedi centrifugiranje u Beckman ultracentrifugi preko noći (16 – 20 h) pri 20 °C i 60000 x g.. Nakon centrifugiranja virusi se nalaze u sloju pri sredini epruvete za centrifugiranje na mjestu gdje gustoća virusa odgovara gustoći u gradijentu CsCl. Ponovno se virusi skupljaju pomoću šprice s iglom u novu mikroeprevetu u volumenu do 1 mL. Slijedi uklanjanje CsCl iz pročišćenih virusa gel filtracijom pomoću Sephadex G-25M kolone. Prvo je potrebno minimalno 6 puta isprati kolonu s po 5 mL PBS-a nakon čega se dodaje izolirani virus i sakupljaju se eluati. Kolona se ispiru u intervalima s 500 µL PBS-a i sakupljaju se eluati u frakcijama. Frakcije koje sadrže virus pomiješaju se i dodaje se glicerol u količini 10 % konačnog volumena. Dobivena suspenzija pročišćenih virusa se alikvotira i smrzava pri -80 °C.

### 3.2.11. Određivanje koncentracije pročišćenih virusa

Koncentracija pročišćenih virusa određena je spektrofotometrijskom metodom (Mittereder i sur.1996). Metoda započinje pripremom otopina virusa razrijeđenih u PBS-u i 0.1 % SDS-u. Pripremi se više razrjeđenja virusa zbog toga što je potrebno da dobivene apsorbancije budu u linearnom rasponu jednadžbe korištene za određivanje koncentracije virusa. Mjerenju apsorbancije prethodi inkubacija virusnih razrjeđenja pri 56 °C tijekom 10 minuta kako bi se oslobodila viralna DNA iz kapsida. Nakon toga, uzorci se centrifugiraju 30 sekundi na 10 000 x g. Slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm. Koncentracija virusnih čestica računa se prema jednadžbi:

$$N = A_{260} \cdot r \cdot 1,1 \cdot 10^{12} \text{ vp/mL}$$

gdje N označava broj virusnih čestica u mililitru (vp/mL),  $A_{260}$  označava apsorbanciju pri 260 nm, a r je razrjeđenje virusa.

Primjer proračuna:

Pripremljena su tri razrjeđenja pročišćenih virusa  $N_1$  (5 x razrjeđenje),  $N_2$  (10 x razrjeđenje) i  $N_3$

(20 x razrjeđenje). Nakon očitavanja  $A_{260}$  određene su koncentracije virusa;

$$N_1 = 0,1055 \cdot 5 \cdot 1,1 \cdot 10^{12} = 5,8025 \cdot 10^{11}$$

$$N_2 = 0,0435 \cdot 10 \cdot 1,1 \cdot 10^{12} = 4,875 \cdot 10^{11}$$

$$N_3 = 0,0200 \cdot 20 \cdot 1,1 \cdot 10^{12} = 4,400 \cdot 10^{11}$$

Da bi se odredila zaključna koncentracija pročišćenih virusa, određena je srednja vrijednost između tri razrjeđenja te ona iznosi:

$$\frac{N_1 + N_2 + N_3}{3} = \frac{5,803 \cdot 10^{11} + 4,975 \cdot 10^{11} + 4,400 \cdot 10^{11}}{3} = 5 \cdot 10^{11} \text{ vp/mL}$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati ulogu Rab proteina (Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11) u uspješnosti transdukcije epitelnih stanica čovjeka s adenovirusom čovjeka tipa 26 (HAdV-D26). Adenovirusi su umnoženi u HEK-293-K1 stanicama i pročišćeni centrifugiranjem na jastučiću i gradijentu CsCl te im je određena koncentracija. Za određivanje uloge Rab proteina u transdukciji s HAdV-D26 korištene su adherentne A549 stanice, stanice adenokarcinoma pluća čovjeka. Stanice su transficirane plazmidima koji kodiraju za Rab-WT i -DN proteine. Da bi se utvrdio identitet plazmida, provedena je restrikcijska analiza, a rezultati gel elektroforeze potvrdili su odgovarajuću veličinu DNA odsječaka. Napravljeno je poravnanje slijedova aminokiselina Rab WT i DN parova proteina kako bi se odredio položaj mutacija i promjena aminokiselina. Optimizacija transfekcije provedena je kako bi se odredile količine DNA i transfekcijskog reagensa koje rezultiraju najvećim udjelom živih transficiranih stanica. Uspješnost transfekcije je praćena pomoću protočne citometrije i konfokalne mikroskopije. Nakon optimizacije, stanice su transficirane plazmidima koji kodiraju za Rab-WT i -DN proteine te transducirane s HAdV-D26. Uspješnost transfekcije i transdukcije u stanicama praćena je pomoću protočne citometrije i konfokalne mikroskopije.

Rezultati su pokazali da je uspješnost transdukcije s HAdV-D26 smanjena u stanicama s ekprimiranim Rab5-DN, Rab7-DN i Rab9-DN u odnosu na Rab5-WT, Rab7-WT i Rab9-WT, što ukazuje na ulogu navedenih Rab proteina u adenovirusnoj infekciji. Rezultati su uspoređeni s dosadašnjim saznanjima o ulozi Rab proteina u endocitozi virusa.

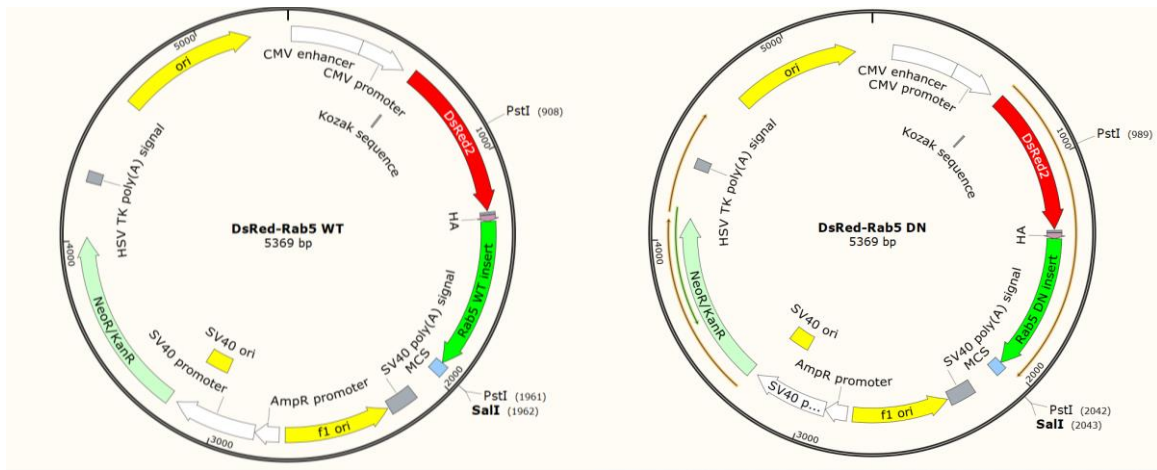
#### 4.1. ANALIZA PLAZMIDA

Plazmidi korišteni u ovom radu prethodno su konstruirani (Sharma i sur., 2003; Choudhury i sur., 2002), a njihove mape pohranjene su u bazi podataka Addgene (informacije navedene u Tablici 5). Svi korišteni plazmidi kao okosnicu sadrže plazmid pDsRed-C1, koji kao fuzijski protein u istom okviru čitanja sadrže DsRed1 i pojedini Rab protein. S obzirom da dostupne mape nisu imale označen položaj pojedinog RAB gena, oni su označeni pomoću programa SnapGene. Prvo je slijed nukleotida u otvorenom okviru čitanja nakon DsRed1, Kozak slijeda i HA biljega pa sve do stop kodona kopiran i pomoću alata NCBI DNA Blast izvršena je identifikacija gena. Slijed nukleotida iz plazmida uspoređen je sa slijedom nukleotida genoma čovjeka, a rezultati su prikazani u tablici 7. Ovako su analizirani geni koji kodiraju samo za divlji tip pojedinog Rab proteina.

**Tablica 7.** Rezultati analize DNA slijedova iz plazmida pomoću alata NCBI DNA Blast.

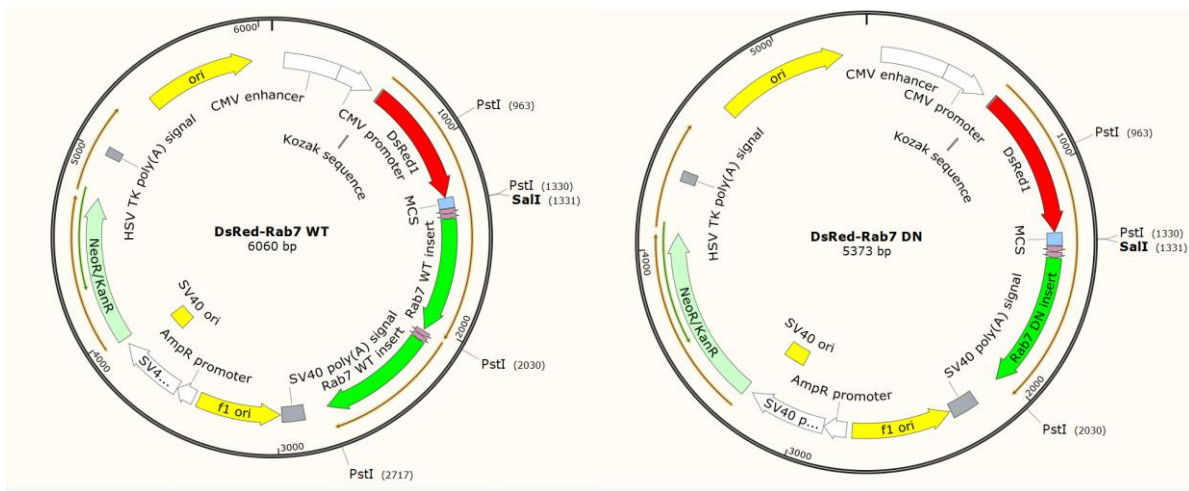
Očekivani gen iz plazmida	Gen iz NCBI baze podataka	Pristupni broj u bazi NCBI	Poravnanje
<i>RAB5 WT</i>	Ras-related protein Rab-5A isoform 1 [Homo sapiens]	NP_004153.2	100 %
<i>RAB7 WT</i>	Ras-related protein Rab-7A [Homo sapiens]	NP_004628.4	100 %
<i>RAB9 WT</i>	Ras-related protein Rab-9A [Homo sapiens]	NP_001182257.1	100 %
<i>RAB11 WT</i>	Ras-related protein Rab-11A [Homo sapiens]	NP_004654.1	100 %

Identifikcija DNA slijeda iz plazmida potvrdila je da navedeni geni doista kodiraju za pojedine Rab proteine. Označeni položaji pojedinog RAB gena pokazani su na Slici 7.



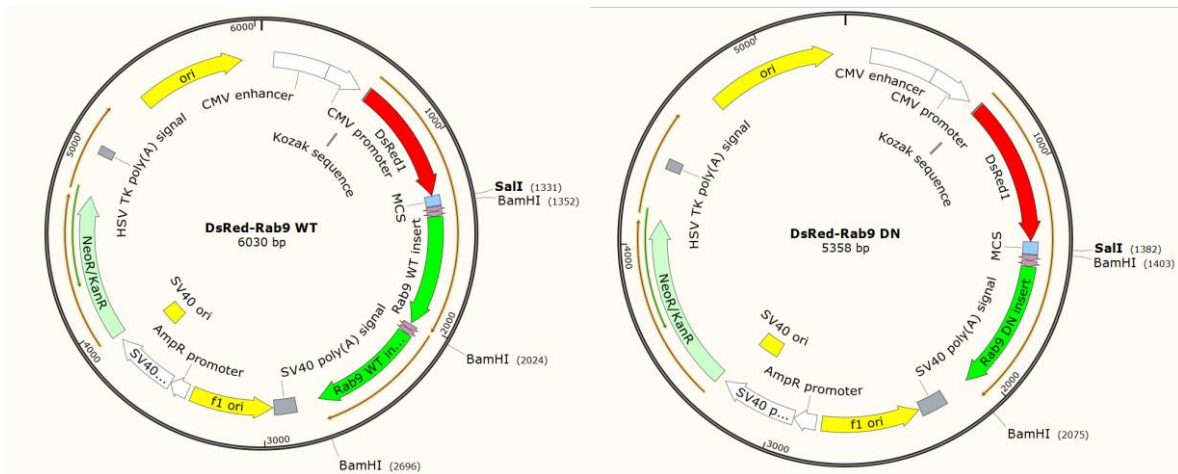
a)

b)



c)

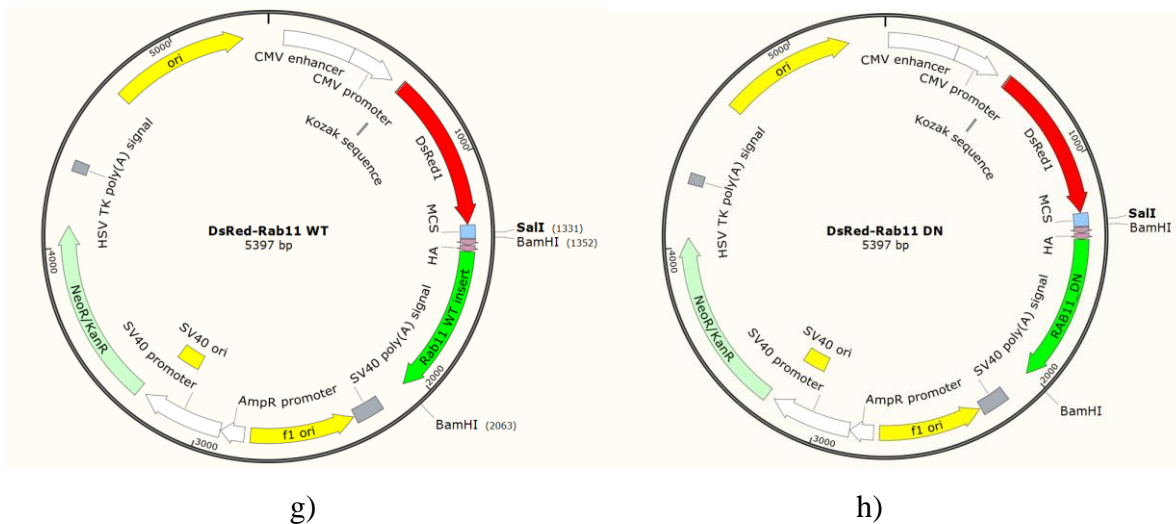
d)



e)

f)





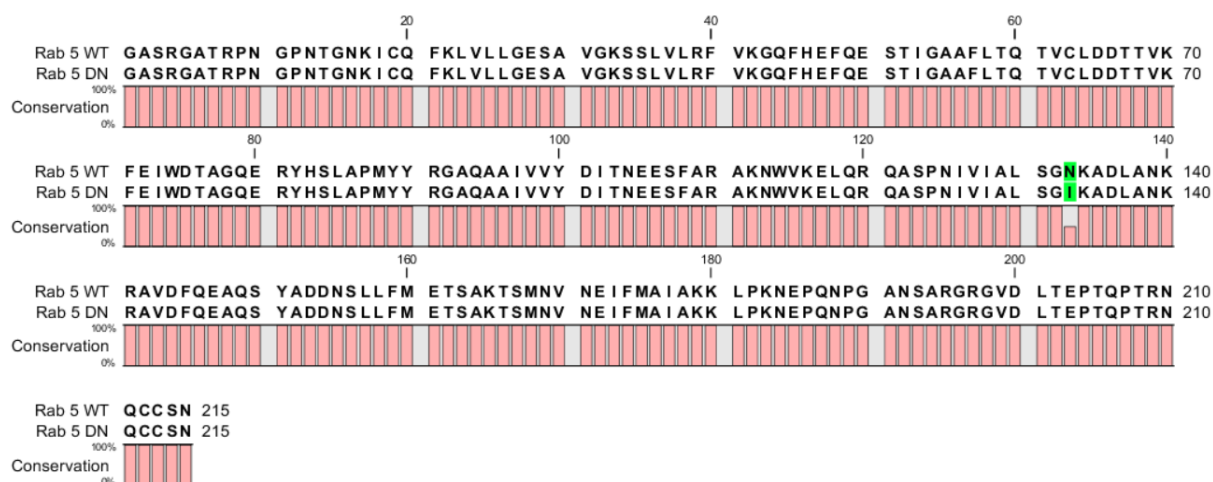
**Slika 7.** Genske mape DsRed-Rab plazmida s označenim insertima i restrikcijskim mjestima. a) DsRed-Rab5 WT plazmid; b) DsRed-Rab5 DN plazmid; c) DsRed-Rab7 WT plazmid; d) DsRed-Rab7 DN plazmid; e) DsRed-Rab9 WT plazmid; f) DsRed-Rab9 DN plazmid; g) DsRed-Rab11 WT plazmid; h) DsRed-Rab11 DN plazmid.

#### 4.1.1. Usporedba WT i DN tipova pojedinog Rab proteina

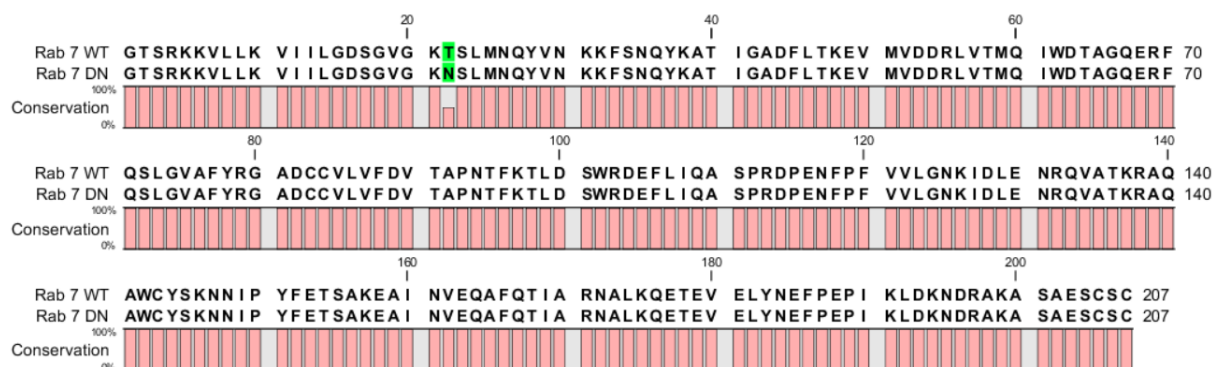
Dominantno negativni tip (DN) Rab proteina se razlikuje od divljeg tipa (WT) Rab proteina u DNA slijedu koji ih kodira što posljedično uzrokuje promjenu slijeda aminokiselina u proteinu. Takva supstitucija aminokiselina onemogućava vezanje GTP-a na Rab DN protein čime se on ne može aktivirati i posljedično ne može vršiti svoju funkciju u stanici (Choudhury i sur., 2002). Dodatno, uspješnu transfekciju stanica s DsRed-Rab plazmidima obilježava značajno veća ekspresija Rab WT i DN proteina u odnosu na ekspresiju staničnih Rab proteina. Zbog povećane ekspresije, javlja se kompeticija s funkcionalnim staničnim Rab proteinima za efekte koji omogućuju djelovanje aktiviranih Rab proteina.

Da bi se utvrdilo u kojoj aminokiselini se razlikuju pojedini WT i DN Rab proteini, napravljena je usporedba njihovih slijedova aminokiselina. Prvo su DNA slijedovi RAB gena iz mape plazmida pomoću programa ExPasy Translate Tool translaterani u slijed aminokiselina, nakon čega su korištenjem programa CLC Sequence Viewer uspoređeni slijedovi aminokiselina između Rab proteina divljeg tipa i pripadajućih dominantno negativnih verzija Rab proteina, a njihova poravnanja prikazana su na Slici 8. Tako se Rab5 WT i Rab5 DN razlikuju u 133. aminokiselini gdje je asparagin (N; kod WT) zamijenjen s izoleucinom (I; kod DN) (Slika 8a). Rab7 WT i Rab7 DN proteini razlikuju se u 22. aminokiselini gdje je treonin (T; kod WT)

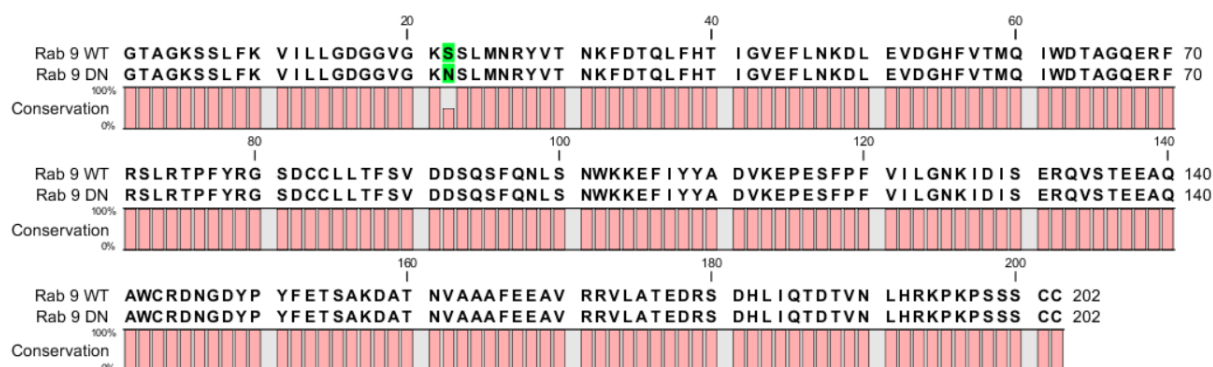
zamijenjen s asparaginom (N; kod DN) (Slika 8b). Rab9 WT i Rab9 DN se razlikuju u 22. aminokiselini gdje je serin (S; kod WT) zamijenjen s asparaginom (N; kod DN) (Slika 8c), a Rab11 WT i Rab11 DN razlikuju se u 24. aminokiselini gdje je serin (S; kod WT) zamijenjen s asparaginom (N; kod DN) (Slika 8d).



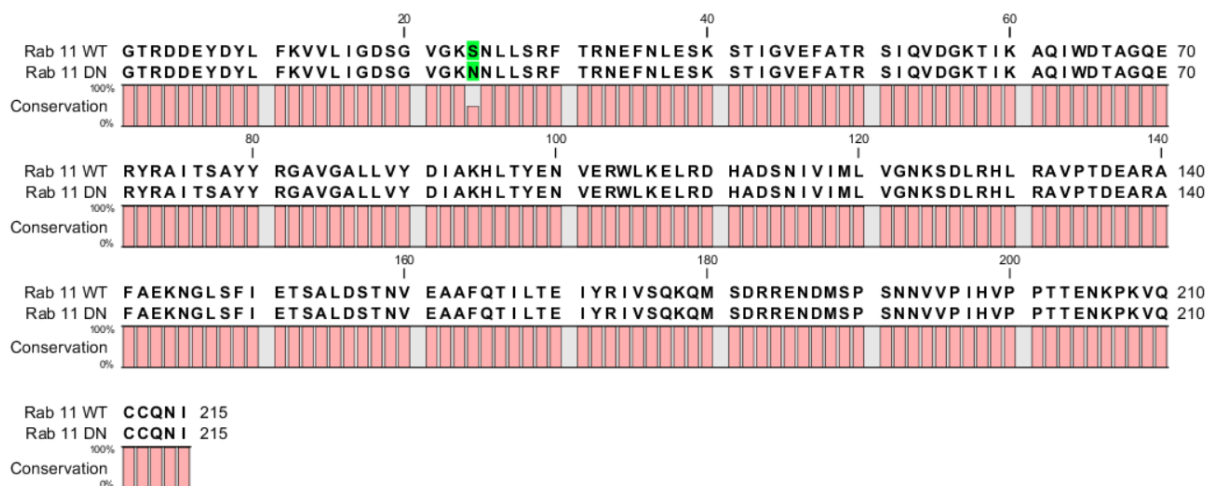
a)



b)



c)



d)

**Slika 8:** Prikaz poravnanja aminokiselina između WT i DN tipova Rab proteina a) usporedba Rab5 WT i Rab5 DN. b) usporedba Rab7 WT i Rab7 DN. c) usporedba Rab9 WT i Rab9 DN. d) usporedba Rab11 WT i Rab11 DN. Slova su jednoslovne oznake aminokiselina u slijedu proteina. Brojevi označavaju položaj aminokiselina u proteinu. Ružičastom bojom označena su poklapanja u poravnanju aminokiselina dva proteina, dok je zelenom bojom označena aminokiselina koja se između proteina razlikuje.

Plazmidi korišteni za izradu ovog diplomskog rada također su korišteni u istraživanju endocitoze virusa kao što su LCMV (engl. *Lymphocytic choriomeningitis virus*) (Quirin i sur., 2008), ABLV (engl. *Australian bat lyssavirus*) (Wier i sur., 2014) i JEV (engl. *Japanese Encephalitis Virus*) (Kalia i sur., 2012).

#### 4.1.2. Restriksijska analiza i gel elektroforeza

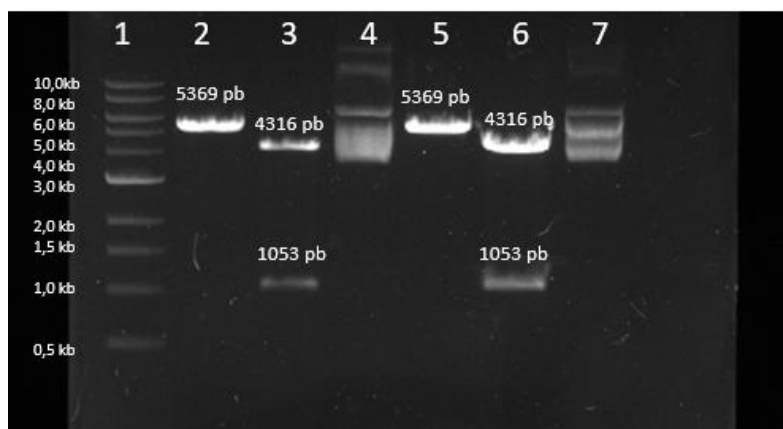
S obzirom da su plazmidi prethodno umnoženi i izolirani u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, prije njihovog korištenja potrebno je provjeriti identitet plazmida, tj. jesu li umnoženi ispravni plazmidi ili je li možda došlo do promjena u DNA slijedu prilikom umnožavanja i izolacije plazmida. Korištenjem programa SnapGene određeni su restriksijski enzimi koji su korišteni kako bi se plazmidna DNA pocijepala na fragmente određene duljine i nakon gel elektroforeze usporedila s očekivanom duljinom fragmenata. Za pojedini plazmid odabran je restriksijski enzim koji će plazmid pocijepati na samo jednom mjestu te restriksijski enzim koji će plazmid pocijepati na dva ili tri mjesta, pritom pazeći da se veličina fragmenata može ispravno očitati na gelu, npr. da fragmenti nisu prekratki, jednake ili slične veličine. Tako

su pDsRed-Rab5 WT i DN pocijepani s Sall ili PstI restriksijskim enzimima, a njihovi rezultati gel elektroforeze nakon restikcije prikazani su na Slici 9a. Korištenjem restriksijskog enzima Sall koji plazmide DsRed-Rab5 WT i DN reže na samo jednom restriksijskom mjestu, dobiven je samo jedan fragment DNA pojedinog plazmida koji svojom veličinom odgovara veličini plazmida. Dodatno, korištenjem plazmida BamHI koji plazmide DsRed-Rab5 WT i DN reže na dva restriksijska mjesta dobivena su dva fragmenta. Zbroj veličina dvaju dobivenih fragmenata odgovara veličini plazmida.

Nadalje, rezultati elektroforeze nakon restrikcije DsRed-Rab7 WT i DN plazmida prikazani su na Slici 9b. Korištenjem enzima Sall koji reže na samo jednom restriksijskom mjestu dobiven je jedan fragment DNA pojedinog plazmida čija veličina odgovara veličini plazmida. Korištenjem restriksijskog enzima PstI dobivena su četiri fragmenta čiji zbroj veličina odgovara veličini plazmida DsRed-Rab7 WT, to jest tri fragmenta čiji zbroj veličina odgovara veličini plazmida DsRed-Rab7 DN.

Rezultati elektroforeze DsRed-Rab9 WT i DN proteina prikazani su na Slici 9c. Korišteni enzim Sall reže na samo jednom restriksijskom mjestu te je veličina pojedinih DNA fragmenata jednaka veličinama plazmida. Dodatno, korištenjem restriksijskog enzima BamHI dobivena su tri fragmenta čiji zbroj veličina odgovara veličini DsRed-Rab9 WT plazmida, to jest dva fragmenta čiji zbroj veličina odgovara veličini DsRed-Rab9 DN plazmida.

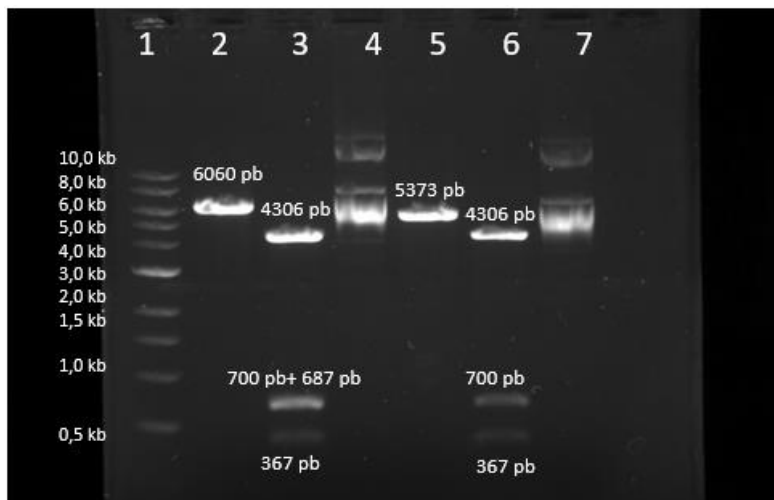
Nadalje, rezultati elektroforeze DsRed-Rab11 WT i DN plazmida prikazani su na Slici 9d. Korišten je restriksijski enzim Sall reže samo na jednom restriksijskom mjestu te veličina dobivenog pojedinog DNA fragmenta odgovara veličini pojedinog plazmida. Korištenjem restriksijskog enzima BamHI dobivena su dva fragmenta čiji zbroj veličina odgovara veličini plazmida.



Uzorci:

- 1: NEB 1kb DNA ladder
- 2: DsRed-Rab5 WT/SacI
- 3: DsRed-Rab5 WT/BamHI
- 4: DsRed-Rab5 WT
- 5: DsRed-Rab5 DN/SacI
- 6: DsRed-Rab5 DN/BamHI
- 7: DsRed-Rab5 DN

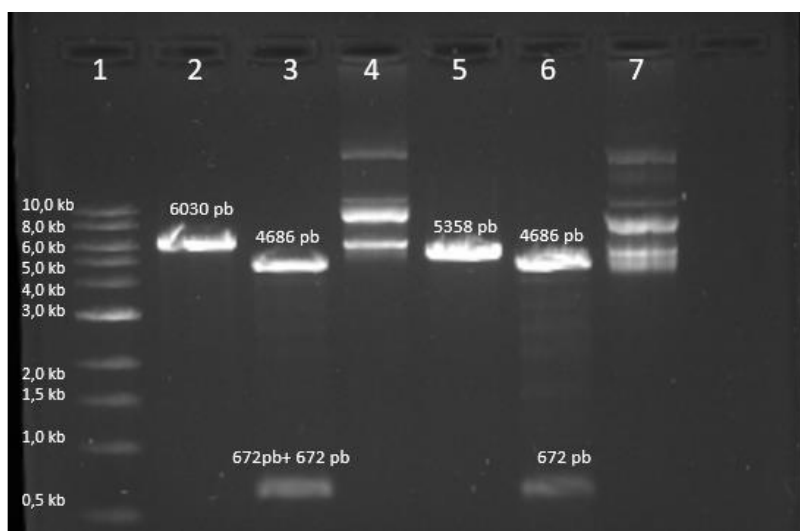
a)



Uzorci:

- 1: NEB 1kb DNA ladder
- 2: DsRed-Rab7 WT/Sall
- 3: DsRed-Rab7 WT/PstI
- 4: DsRed-Rab7 WT
- 5: DsRed-Rab7 DN/Sall
- 6: DsRed-Rab7 DN/PstI
- 7: DsRed-Rab7 DN

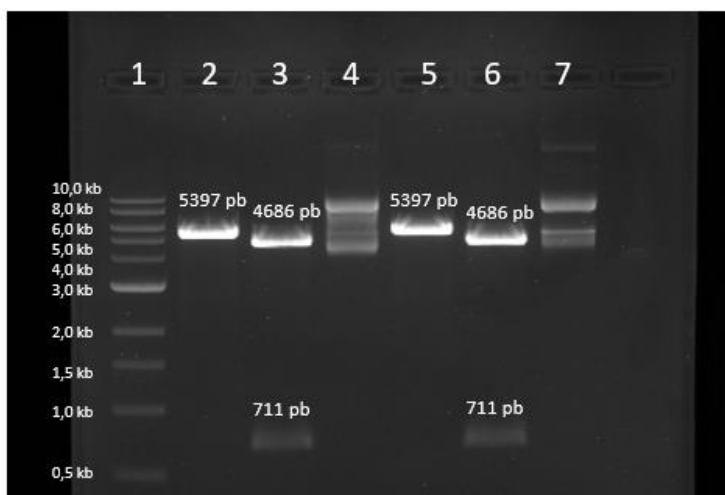
b)



Uzorci:

- 1: NEB 1 kb DNA ladder
- 2: DsRed-Rab9 WT/Sall
- 3: DsRed-Rab9 WT/BamHI
- 4: DsRed-Rab9 WT
- 5: DsRed-Rab9 DN/Sall
- 6: DsRed-Rab9 DN/BamHI
- 7: DsRed-Rab9 DN

c)



Uzorci

- 1: DsRed-NEB 1kb DNA ladder
- 2: DsRed-Rab11 WT/Sall
- 3: DsRed-Rab11 WT/BamHI
- 4: DsRed-Rab11 WT
- 5: DsRed-Rab11 DN/Sall
- 6: DsRed-Rab11 DN/BamHI
- 7: DsRed-Rab11 DN

d)

**Slika 9.** Prikaz agaroznog gela nakon restrikcije: a) DsRed-Rab5 WT i DsRed-Rab5 DN

plazmida; **b)** DsRed-Rab7 WT i DsRed-Rab7 DN plazmida; **c)** DsRed-Rab9 WT i DsRed-Rab9 DN plazmida; **d)** DsRed-Rab11 WT i DsRed-Rab11 DN plazmida. Brojevi 1-7 označuju uzorke opisane s desne strane, a brojevi iznad detektiranih vrpce DNA fragmenata pokazuju očekivanu veličinu. Korištenjem programa SnapGene određena je veličina očekivanih restrikcijskih fragmenata nakon cijepanja restrikcijskim enzimima te su oni označeni iznad pojedine vrpce.

Nakon provedene restrikcijske analize može se zaključiti da su plazmidi ispravni i da tijekom umnožavanja i izolacije nije došlo do promjene u slijedu DNA.

#### 4.2. OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE

Kako je opisano u poglavlju 3.2.4. za transfekciju stanica s plazmidima korišten je transfekcijski reagens Lipofectamin 2000. Tijekom transfekcije cilj je dobiti što veću uspješnost transfekcije, tj. što veći postotak stanica transficiran željenim plazmidom. Pritom je potrebno odrediti optimalnu količinu DNA plazmida određene veličine te optimalnu količinu lipofektamina koji će omogućiti visoku uspješnost transfekcije, a da pritom nije toksičan za stanice (Wang i sur., 2018; Lesueur i sur., 2016). Stoga je prvotno provedena optimizacija transfekcije kako bi se odredio omjer količine plazmida i lipofektamina koji bi omogućili visoku uspješnost transfekcije. Protokol transfekcije kao i korištene količine DNA i Lipofectamine-a 2000 određeni su prema prijedlogu proizvođača, a količine su prikazane u Tablicama 8 i 9.

**Tablica 8.** Uvjeti korišteni za optimizaciju transfekcije stanica uzgojenih na stakalcima u pločici za uzgoj stanica s 24 bunarića.

UZORAK	DNA (ng)	Lipofectamine 2000 (µL)
1	400	2,5
2	500	2,5
3	600	2,5
4	500	1,5
5	500	2
6 – kontrola	/	/

**Tablica 9.** Uzorci korišteni za optimizaciju stanica uzgojenih u pločici za uzgoj stanica s 12 bunarića.

<b>UZORAK</b>	<b>DNA (ng)</b>	<b>Lipofectamine 2000 (μL)</b>
1	1250	3
2	1250	5
3	1250	7
4	1000	5
5	1500	5
6	2000	5
7 – kontrola	/	/

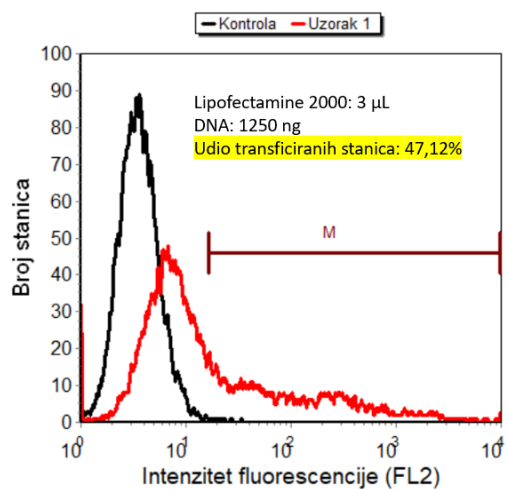
Za optimizaciju transfekcije korišten je plazmid DsRed-Rab5 WT, čiji primjer proračuna je naveden u Tablici 10.

**Tablica 10.** Primjer proračuna za pripremu otopina za transfekciju stanica u pločici za uzgoj stanica s 12 bunarića

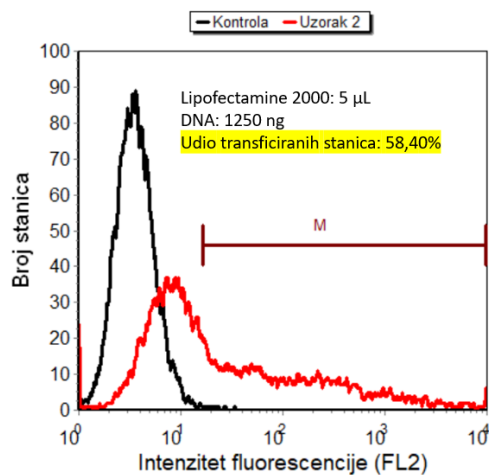
<b>Reakcijska smjesa</b>	<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Otopina A, 100 μL	plazmidna DNA (DsRed-Rab5 WT) Koncentracija: 404,55 ng/μL	1,24 μL
	OptiMEM	98,76 μL
Otopina B, 100 μL	Lipofectamine 2000	5 μL
	OptiMEM	95 μL
Ukupna transfekcijska smjesa	A+B, 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi	200 μL

Za stanice uzgajane u formatu pločica za uzgoj stanica s 12 bunarića, DsRed-Rab5 WT plazmid je korišten za optimizaciju transfekcije praćenu protočnom citometrijom. Za analizu protočnom citometrijom korišten je kanal FL-2 koji detektira emisiju crvene fluorescencije koja proizlazi iz DsRed1 proteina čiji je gen fuzioniran s genom Rab proteina u korištenim plazmidima. Stoga je uspješnost transfekcije ekvivalentna fluorescenciji DsRed1 proteina. Na Slici 10 prikazani su

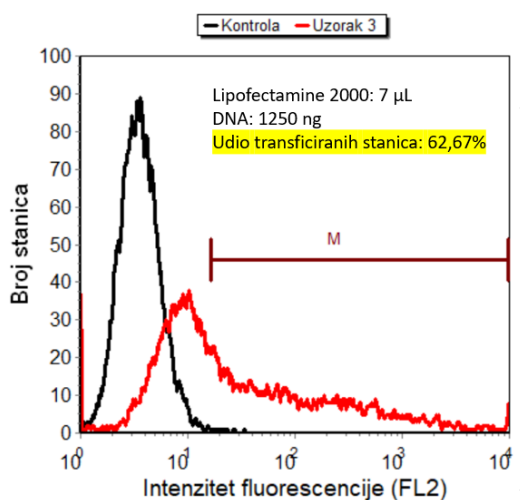
rezultati emisije crvene svjetlosti iz svakog uzorka dobiveni protočnom citometrijom, a obrađeni u programu FCS Express.



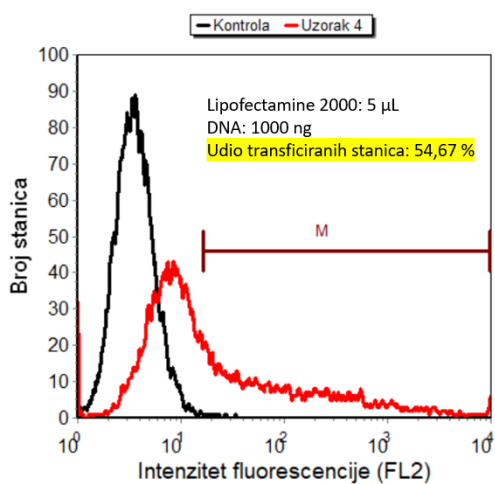
a)



b)

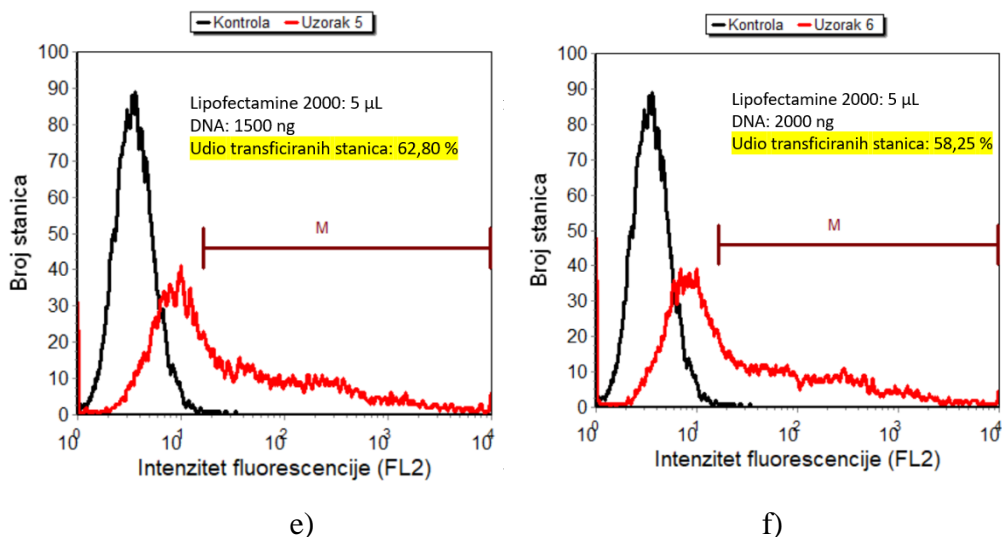


c)



d)

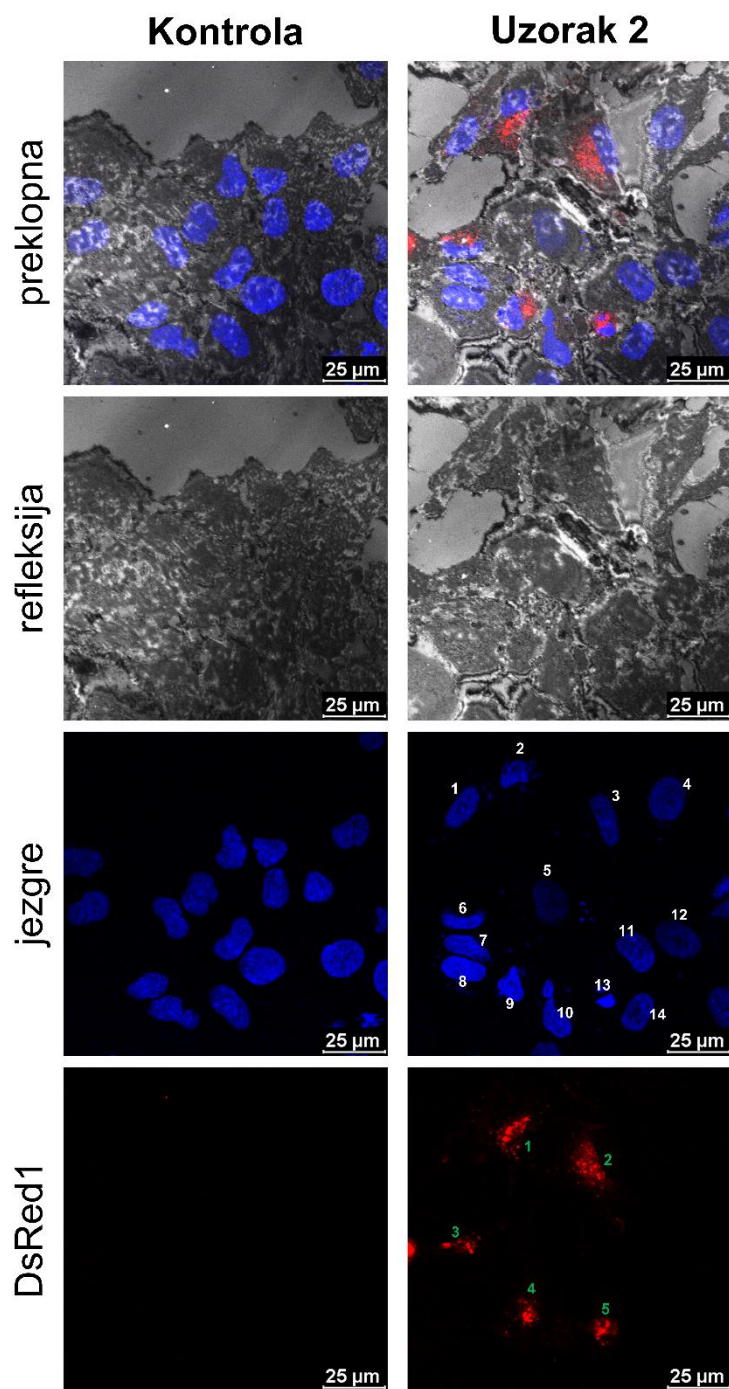




**Slika 10.** Uspješnost transfekcije za uvjete: a) uzorka 1; b) uzorka 2; c) uzorka 3; d) uzorka 4; e) uzorka 5; f) uzorka 6. Crni histogram prikazuje kontrolni uzorak (netransficirane stanice), dok crveni histogram prikazuje uzorak transficiran plazmidom. Uvjeti transfekcije (količina lipofektamina u  $\mu\text{L}$  te količina DNA u ng) te uspješnost transfekcije (%) navedeni su u gornjem desnom kutu za pojedini uzorak. M označava marker koji je postavljen tako da ne uključuje signal netransficiranih stanica (autofluorescencija stanica), a uključuje dio spektra u kojem je određen udio transficiranih stanica.

Kao što je vidljivo iz Slike 10, uspješnost transfekcije se za istu količinu DNA (1250 ng) povećava s povećanjem korištene količine lipofektamina. Međutim, za istu količinu lipofektamina (5  $\mu\text{L}$ ) uspješnost transfekcije se povećava s povećanjem količine DNA do 1500 ng, ali je za količinu DNA od 2000 ng niža nego za količinu DNA od 1500 ng, tj. uspješnost transfekcije za istu količinu korištenog lipofektamina nije linearno ovisila o količini korištene DNA. Uspješnost transfekcije najviša je u uzorcima 3 (62,67 %) i 5 (62,80 %), uz njihove međusobno zanemarive razlike. S obzirom da je primjećeno da u uvjetu 3 u kojem je korištena najviša količina lipofektamina (7  $\mu\text{L}$ ) dolazi do zaokruživanja stanica tijekom inkubacije što je praćeno pod svjetlosnim mikroskopom, pretpostavljeno je da ova količina lipofektamina uzrokuje povećanu toksičnost za stanice, stoga je odlučeno da se uvjeti uzorka 5 (1500 ng DNA, 5  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000) koriste u daljnjim eksperimentima za stanice uzgajane u formatu pločica za uzgoj stanica s 12 bunarića.

Za stanice uzgajane na stakalcima u formatu pločica za uzgoj stanica s 24 bunarića, DsRed-Rab5 WT plazmid je korišten za optimizaciju transfekcije praćenu konfokalnom mikroskopijom. Slike dobivene konfokalnom mikroskopijom obrađene su u programu Image J. Ukupan broj stanica u pojedinom vidnom polju određen je brojanjem jezgara koje zbog DAPI-ja emitiraju plavu svjetlost. Višejezgrene stanice, raspadnute stanice, stanice u diobi te stanice koje nisu cjelovite u vidnom polju nisu bile pobrojane. Kako bi se osigurala točnost u brojanju, korišten je i prikaz refleksije na kojem su jasno vidljive granice između stanica te kako bi se mogle razlikovati stanice u diobi i raspadnute stanice zato što se iz prikaza gdje su samo jezgre takve stanice ne mogu identificirati sa sigurnošću. Broj transficiranih stanica određen je iz prikaza gdje je sniman DsRed1 jer se u tom prikazu najčišće vidi crveni signal uz pomoć preklopnog prikaza gdje se jasno vidi koji crveni signal pripada kojoj stanici. Pod istim uvjetima konfokalne mikroskopije bio je sniman i kontrolni uzorak (netransficirane stanice). Reprezentativna vidna polja uzorka 2 te kontrolnog uzorka (netransficirane stanice) u kojem očekivano nije bilo signala DsRed1, dobivena konfokalnom mikroskopijom, prikazana su na Slici 11.



**Slika 11.** Prikaz reprezentativnog vidnog polja kontrolnog uzorka (desno) i uzorka 2 (lijevo). Prikazana su tri snimana kanala te preklopna slika gdje su snimke sva tri kanala spojene. Refleksija je snimana pri valnoj duljini od 615 nm kako bi se dobili obrisi stanica. Jezgre su prethodno obrađene DAPI-jem te imaju svojstvo plave fluorescencije ( DAPI:  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 405 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 410\text{-}480 \text{ nm}$ ). Bijele brojke prikazuju pobrojane jezgre. Kanalom DsRed1 sniman je crveni fluorescentni signal kojeg emitira DsRed1 protein koji je fuzioniran s Rab genima u

plazmidima korištenim za transfekciju stanica (DsRed1;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 558 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 568\text{-}610 \text{ nm}$ ). Zelene brojke prikazuju pobrojane uspješno transficirane stanice.

U Tablici 11 prikazani su rezultati optimizacije praćene konfokalnom mikroskopijom za DsRed-Rab5 WT plazmid. Uspješnost transfekcije povećava se povećanjem količine lipofektamina do 2,5  $\mu\text{L}$  i DNA do 500 ng. Uspješnost transfekcije nije linearno ovisila o količini korištene DNA zato što se udio transfekcije u uzorku s količinom DNA od 600 ng smanjio pri jednakoj količini korištenog lipofektamina. U tablici 11 vidljivo je da je najveća uspješnost transfekcije bila u uzorku 2 gdje je količina Lipofectamine-a 2000 bila 2,5  $\mu\text{L}$ , a količina DNA 500 ng, stoga su ti uvjeti primjenjeni u daljnjim eksperimentima za stanice uzgajane na stakalcima u formatu pločica za uzgoj stanica s 24 bunarića.

**Tablica 11.** Rezultati optimizacije transfekcije A549 stanica s DsRed-Rab5 WT plazmidom određene konfokalnom mikroskopijom. Za pojedini uzorak snimljeno je više vidnih polja, a u ovoj tablici prikazani su zbirni rezultati svih vidnih polja svakog uzorka.

Uzorak	DNA (ng)	Lipofectamine 2000 ( $\mu\text{L}$ )	Ukupan broj stanica	Broj transficiranih stanica	Udio transficiranih stanica
1	400	2,5	305	84	27,05 %
2	500	2,5	296	82	29,76 %
3	600	2,5	465	103	22,64 %
4	500	1,5	524	64	12,35 %
5	500	2	438	83	19,35 %

### 4.3. UMNAŽANJE I PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSNIH VEKTORA

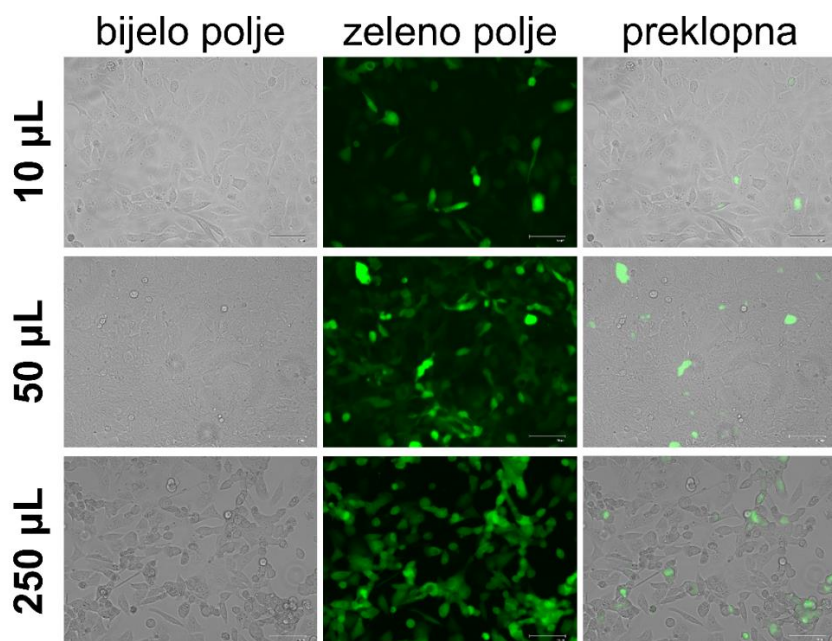
U izradi ovog rada korišten je replikacijski defektan vektor temeljen na adenovirusu tipa 26 (HAdV-D26) koji kao gen dojavljivač sadrži gen koji kodira za zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP). Korišteni virusni vektor nema sposobnost replikacije zbog delecija E1 regije virusnog genoma. U svrhu umnažanja vektora, kako bi se virusi mogli replicirati, korištene su HEK-293-K1 stanice koje imaju stabilno eksprimiranu E1 regiju adenovirusnog genoma što komplementira defekt virusnih vektora koji im onemogućava

replikaciju. HEK-293-K1 stanice su stanični klon HEK-293 stanica sa stabilno povećanom površinskom ekspresijom  $\alpha\beta3$  integrina, izdvojene u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala s ciljem omogućavanja bolje infekcije stanica s HAdV-D26, obzirom da je prethodno pokazano da je  $\alpha\beta3$  integrin receptor za HAdV-D26 (Nestić i sur., 2019).

Replikacijski defektan HAdV-D26 umnožen je u HEK-293-K1 stanicama do pojave citopatogenog učinka (CPU). CPU je pojava morfoloških promjena kao što je formiranje nakupina i zaokruživanje stanica i njihovo odvajanje od podloge kao rezultat virusne infekcije. Zrele adenovirusne čestice pročišćavaju se iz stanica u kojima su virusi umnoženi i sklopljeni u zrele čestice, a da još nije došlo do lize stanice. Poznato je da su adenovirusne čestice zrele 2 do 4 dana nakon infekcije te je poželjno da u tom vremenskom okviru dođe do pojave CPU i skupljanja stanica. U svrhu titracije supernatanta infekcije (opisano u poglavlju 3.2.10.) HEK-293-K1 stanice su inficirane s 10, 50 i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta infekcije. Infekcija stanica praćena je pomoću EVOS Cell Imaging sustava. Nakon 24 h, u stanicama se može primjetiti zelena fluorescencija koja proizlazi od GFP-a čiji gen se nalazi kao transgen u adenovirusu, što indicira uspješnu ekspresiju adenovirusnog genoma. Povećanje fluorescencije kroz vrijeme (intenzitet i veći broj stanica koje fluoresciraju) pokazuje da dolazi do uspješne replikacije adenovirusa, sklapanja adenoviralnih čestica, lize stanica i širenje infekcije u okolne stanice.

Izgled stanica 24 sata nakon infekcije s 10, 50 i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije prikazan je na Slici 12. U svim uvjetima stanice su inficirane, ali ni u jednom slučaju nije došlo do CPU. U stanicama inficiranim s 10  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije uspješnosti infekcije je najmanja što se vidi iz prikaza zelenog polja. Najveća uspješnost infekcije je u stanicama koje su inficirane s 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije što je također vidljivo iz prikaza zelenog polja gdje ima najviše zelenih stanica što je rezultat transkripcije i translacije adenovirusnog transgena za GFP.

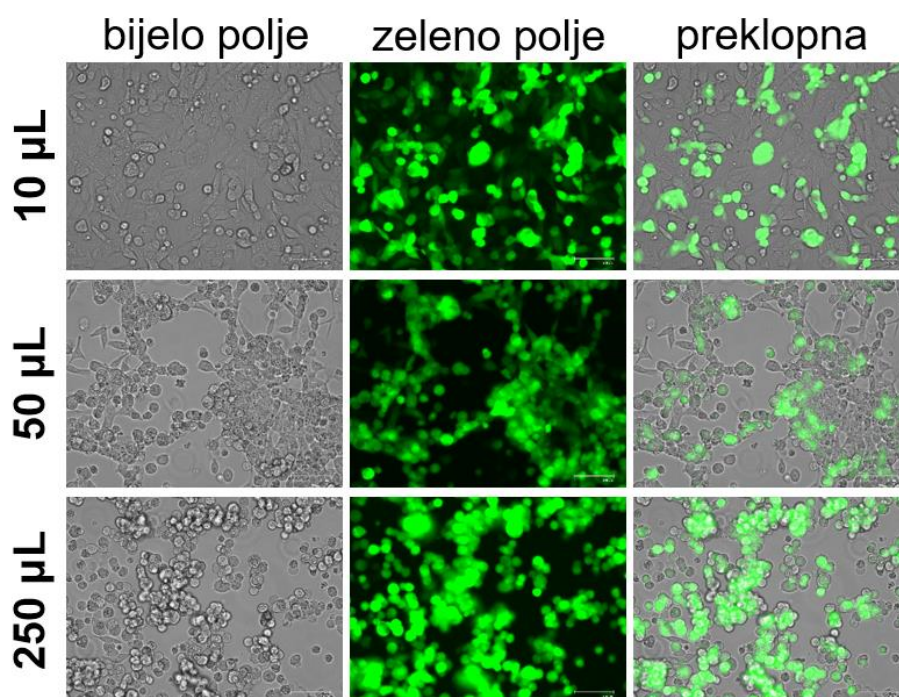
## 24 sata nakon infekcije



**Slika 12.** Praćenje infekcije stanica virusnim česticama pomoću EVOS Cell Imaging sustava 24 sata nakon infekcije sa 10, 50 i 250  $\mu$ L supernatanta virusne infekcije. Prikazano je bijelo polje gdje se vide obrisi stanica, zeleno polje koje je rezultat fluorescencije GFP-a te preklopni prikaz.

Izgled stanica 48 sati nakon infekcije prikazan je na Slici 13. U svim slučajevima je inficiran veći udio stanica nego 24 sata nakon infekcije što znači da je došlo do replikacije adenovirusa i širenja infekcije na ostale stanice. U stanicama inficiranim s 250  $\mu$ L supernatanta stanične infekcije došlo je do pojave CPU što je vidljivo po povećanom broju stanica koje su odignute od podloge, zaokruženim stanicama koje formiraju nakupine. Također, početak CPU primjećen je i u stanicama inficiranim s 50  $\mu$ L supernatanta stanične infekcije.

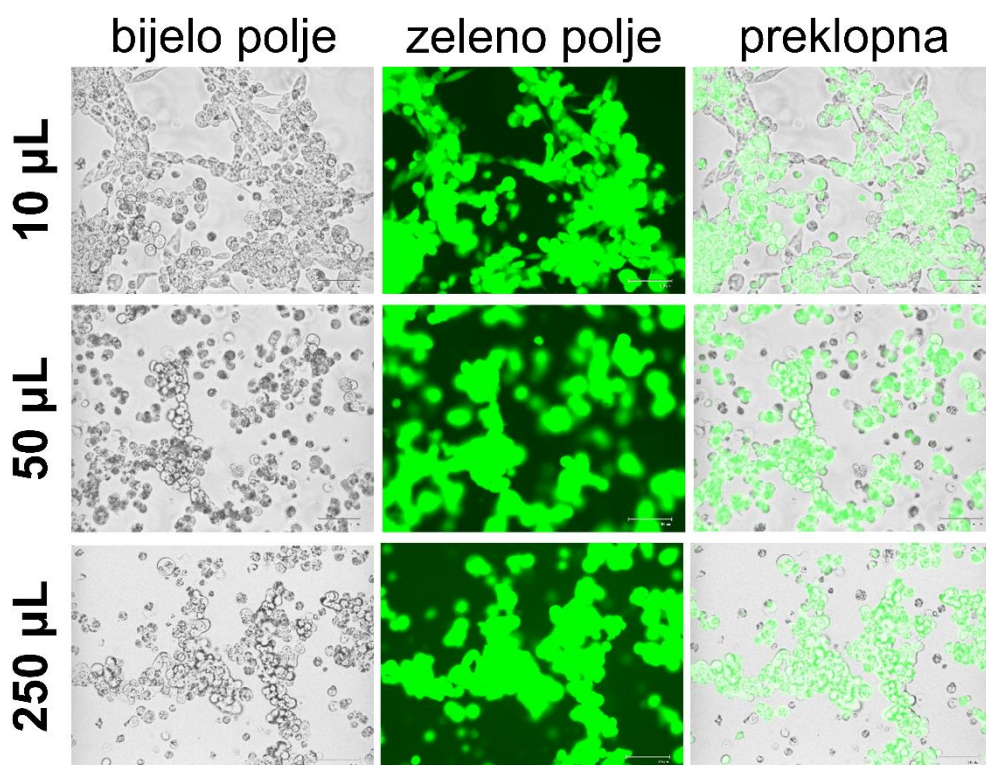
## 48 sati nakon infekcije



**Slika 13.** Praćenje infekcije stanica virusnim česticama pomoću EVOS Cell Imaging sustava 48 sati nakon infekcije sa 10, 50 i 250 µL supernatanta virusne infekcije. Prikazano je bijelo polje gdje se vide obrisi stanica, zeleno polje koje je rezultat fluorescencije GFP-a te preklopni prikaz.

Infekcija nakon 72 sata prikazana je na Slici 14. U svim uvjetima uspješnost infekcije je veća nego nakon 48 sati što je vidljivo iz većeg broja zelenih stanica na preklopnom prikazu i prikazu zelenog polja. U slučaju infekcije s 10 µL supernatanta infekcije došlo je do CPU manjeg intenziteta što je vidljivo iz prikaza bijelog polja gdje je manji udio stanica zaokružen i odvojen od podloge, ali nema većeg formiranja nakupina stanica. Ipak, preklopni prikaz otkriva da je velika većina stanica inficirana virusima. U slučaju infekcije s 50 µL supernatanta infekcije došlo je do CPU što je vidljivo iz nakupina zaokruženih stanica intenzivne zelene fluorescencije koje su odvojene od podloge. Također, nema više stanica koje rastu pričvršćene za podlogu za rast.

## 72 sata nakon infekcije



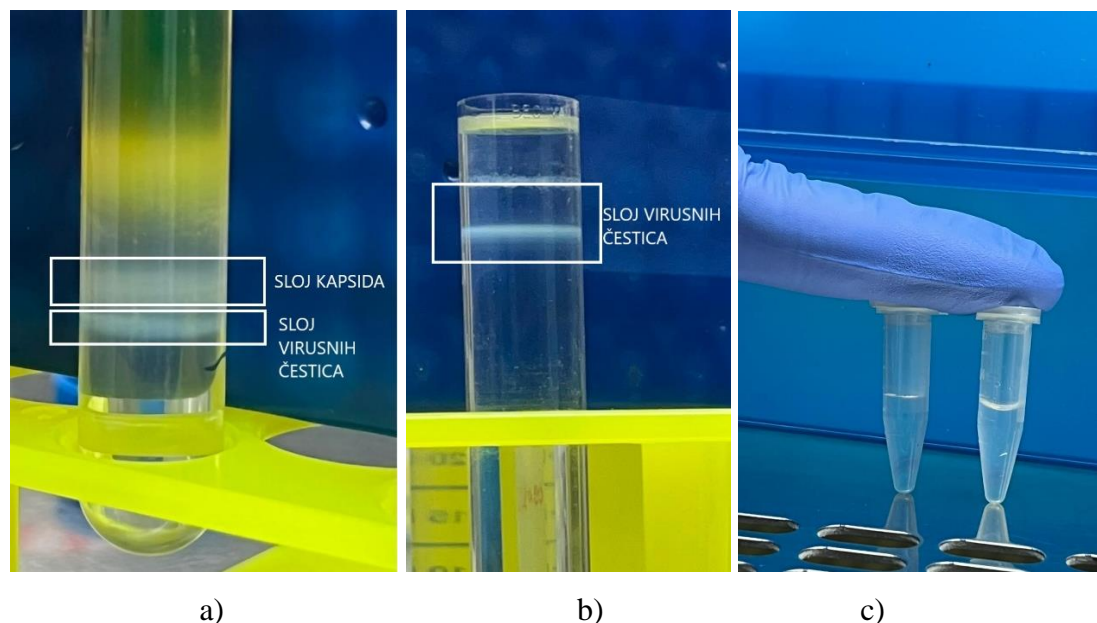
**Slika 14.** Praćenje infekcije stanica virusnim česticama pomoću EVOS Cell Imaging sustava 72 sata nakon infekcije sa 10, 50 i 250 µL supernatanta virusne infekcije. Prikazano je bijelo polje gdje se vide obrisi stanica, zeleno polje koje je rezultat fluorescencije GFP-a te preklopni prikaz.

Na temelju rezultata optimizacije infekcije te iskustva u umnažanju virusa u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala određeno je da je optimalna količina supernatanta infekcije 30 µL da bi se treći dan postigao CPU. Potom je uzgojeno 60 Petrijevih zdjelica HEK-293-K1 stanica i inficirano s 30 µL supernatanta infekcije te je stanični talog skupljen 72 sata nakon infekcije i korišten za pročišćavanje vektora.

Pročišćavanje adenovirusnih vektora opisano je u poglavlju 3.2.10. Epruveta nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl prikazana je na Slici 15 a). U epruveti su vidljiva dva bijela sloja, od kojih gornji sloj odgovara praznim kapsidama i drugim nečistoćama, a donji sloj odgovara virusnim česticama. Zona iznad sloja kapsida i virusnih čestica je zeleno-žute boje zbog GFP-a čiji je gen ugrađen u genom virusa i koji se eksprimira tijekom umnažanja virusa. Na Slici 15 b) prikazan je rezultat centrifugiranja u gradijentu CsCl gdje je jasno vidljiva bijela



zona virusnih čestica. Nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl, iz otopine pročišćenih virusnih čestica uklonjen je CsCl gel filtracijom pomoću kolone Sephadex G-25M. Slika 15 c) prikazuje razliku između eluata koji sadrži virusne čestice i onog koji ne sadrži virusne čestice. Eluat bogat virusnim česticama konkavan je i opalescira što je potvrda prisutnosti virusa. Nakon prikupljanja svih eluata s virusom, u ukupni volumen eluata je dodan glicerol do 10 % konačnog volumena, virusi su alikvotirani i zamrznuti pri -80 °C.



**Slika 15.** Proces pročišćavanja virusa. a) Rezultat centrifugiranja na jastučiću CsCl. Sloj kapsida nalazi se iznad sloja virusnih čestica koji se nalazi u području granice različitih gustoća CsCl. b) Rezultat centrifugiranja u jastučiću CsCl. Vidljiv je bijeli sloj virusnih čestica. c) Razlika eluata bogatog virusnim česticama (desno) i eluata koji ne sadrži virusne čestice (lijevo). Eluat bogat virusnim česticama opalescira i ima konkavnu površinu.

#### **4.4. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI TRANSDUKCIJE A549 STANICA S HAdV-D26 PROTOČNOM CITOMETRIJOM NAKON TRANSFEKCIJE S DsRed-Rab PLAZMIDIMA**

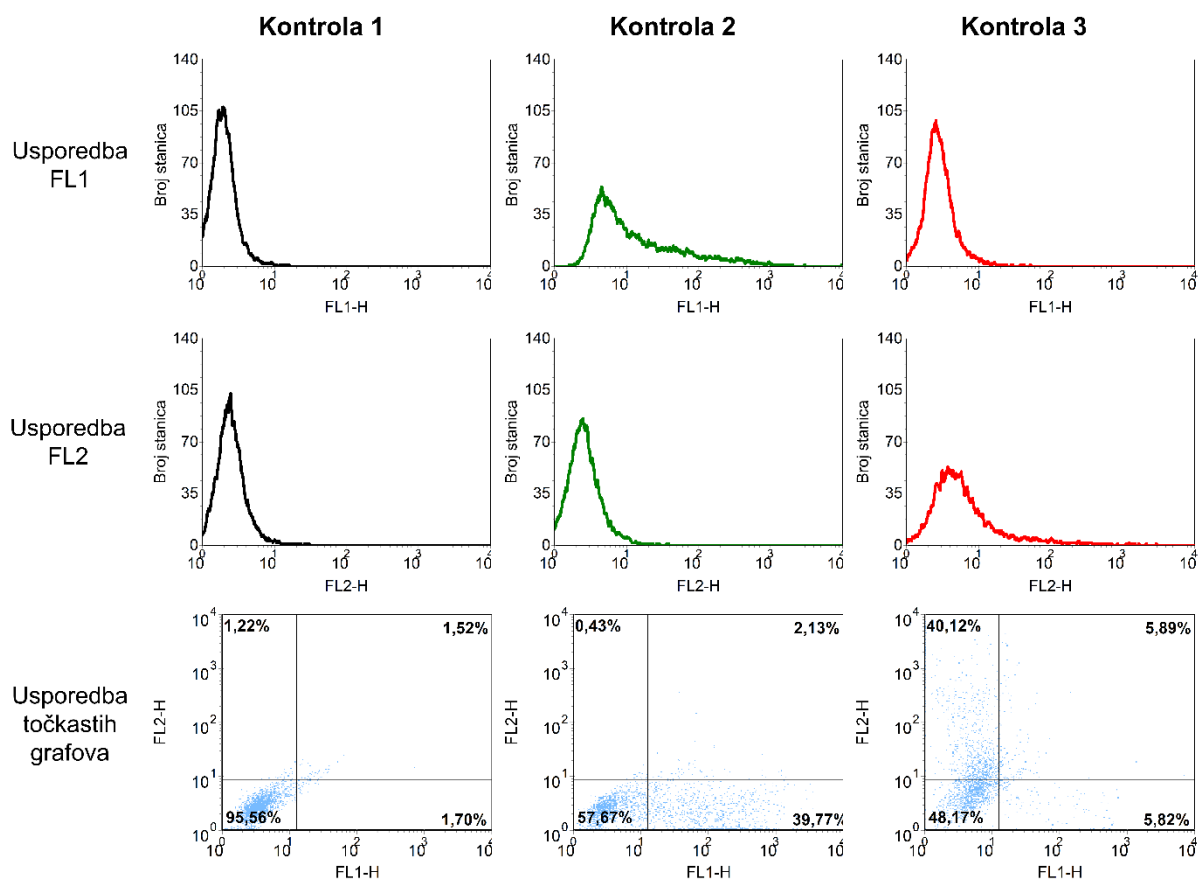
Cilj ovog rada je ispitati ulogu Rab proteina (Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11) u uspješnosti transdukcije epitelnih stanica čovjeka s HAdV-D26. Stoga su stanice nakon transfekcije pojedinim plazmidom inficirane HAdV-D26, nakon čega je određena uspješnost transdukcije stanica ovisno o tome da li ekspimiraju WT ili DN verziju Rab proteina. Sličan pristup istraživanju gdje je određivana razlika u uspješnosti transdukcije u stanicama transficiranim s

DsRed-Rab DN plazmidima u odnosu na stanice transficirane s DsRed-Rab WT plazmidima pokazana je u nizu istraživanja gdje su primjenjeni slični konstrukti za istraživanje endocitoze drugih virusa. Rauma i sur. pokazali su da Rab5 DN protein znatno inhibira infekciju HeLa stanica rekombinantnim HAdV-C5 i HAdV-B2 virusima (Rauma i sur., 1999). Liu i sur. koristili su DsRed-Rab WT i DN plazmide kako bi istraživali endocitozu JEV-a (engl. *Japanese encephalitis virus*) te su zaključili da je ekspresija Rab5 DN i Rab11 DN značajno inhibirala replikaciju JEV. Njihovi rezultati su dodatno ispitani i potvrđeni utišavanjem ekspresije Rab5 ili Rab11 prije virusne infekcije te praćenjem infekcije konfokalnom mikroskopijom koja je pokazala da su čestice virusa kolokalizirane s Rab5 ili Rab11 unutar 15 minuta nakon ulaska virusa, što sugerira da JEV nakon internalizacije ulazi u rane i reciklirajuće endosome prije oslobađanja virusnog genoma (Liu i sur., 2017). Day i sur. proučavali su ulogu trans-Golgi mreže kod infekcije HPV-16 pseudovirusom (engl. *Human papillomavirus 16 pseudovirus*). Utvrđeno je da Rab9 i Rab7 imaju ulogu u unutar staničnom putovanju HPV-16 pseudovirusa, budući da je ekspresija dominantno negativnih verzija ovih proteina značajno inhibirala HPV16 pseudovirusnu infekciju (Day i sur., 2013). Zhang i sur. istraživali su endocitozu i unutarstanično putovanje CSFV-a (engl. *Classical swine fever virus*). Rezultati su pokazali da Rab5, Rab7 i Rab11 reguliraju endocitozu CSFV-a. Ove rezultate potvrdili su i utišavanjem tih tri Rab proteina. Konfokalna mikroskopija pokazala je da čestice virusa kolokaliziraju s Rab5, Rab7 ili Rab11 unutar 30 minuta nakon ulaska virusa (Zhang i sur., 2018). Johns i sur. pokazali su da je ekspresija Rab5 DN proteina pokazala visoku inhibiciju infekcije FMDV-a (engl. *Foot and Mouth disease virus*), a ekspresija Rab11 DN proteina pokazala je blagu inhibiciju infekcije FDMV-a u odnosu na stanice u kojima su eksprimirani Rab5 WT i Rab11 WT plazmidi (Johns i sur. 2009).

U ovom diplomskom radu, transfekcija sa svakim parom Rab WT i DN plazmida napravljena je shodno dobivenim najboljim uvjetima transfekcije tijekom optimizacije transfekcije (1500 ng DNA, 5  $\mu$ L Lipofectamine 2000; opisano u poglavlju 4.2.), a 24 sata nakon transfekcije stanice su transducirane s HAdV-D26. U stanicama koje su uspješno transducirane, tj. u stanicama u kojima su ostvareni uvjeti uspješnog ulaska, endocitoze i unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 te dopreme genoma do jezgre stanice, ekspresija transgena (GFP) je proporcionalna uspješnosti transdukcije.

Nakon provođenja transfekcije i transdukcije, stanice su fiksirane i analizirane protočnom citometrijom. Korišteni su detektori FL1 i FL2 protočnog citometra. FL1 detektira emisiju

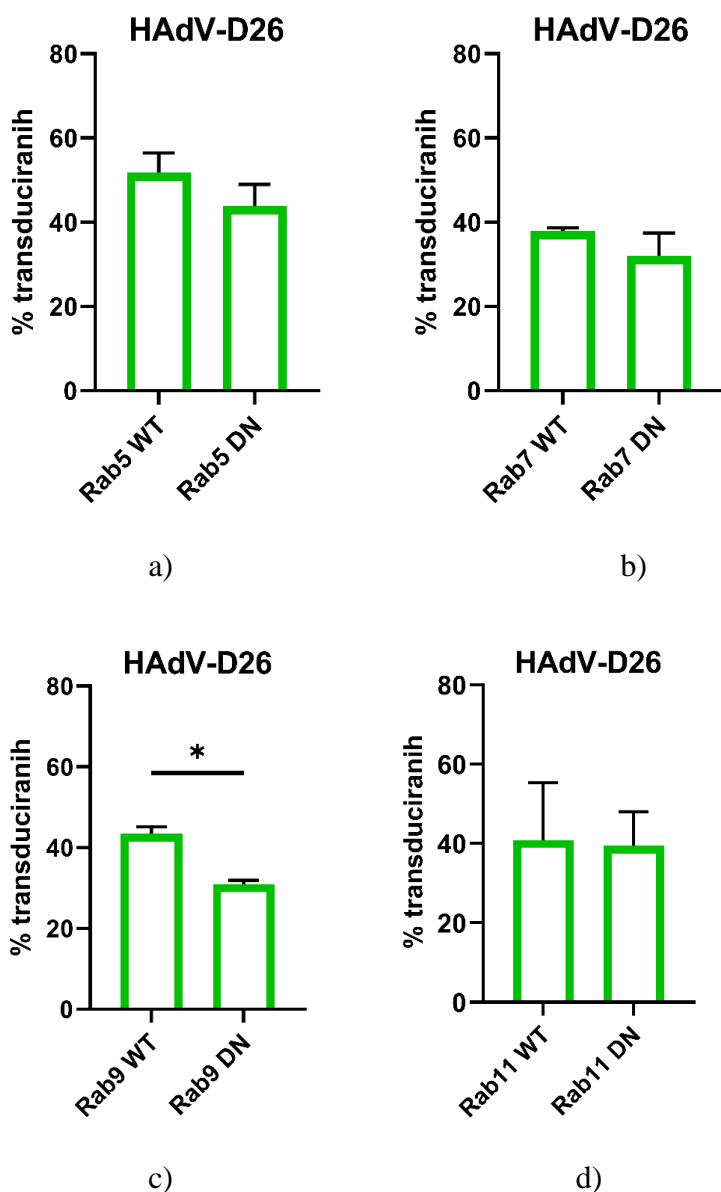
zelene svjetlosti dobivenu nakon pobuđivanja GFP-a iz virusa korištenog u transdukciji stanica, a FL2 detektira emisiju crvene svjetlosti dobivenu nakon pobuđivanja proteina DsRed1 koji je fuzioniran s pojedinim Rab proteinom i kodiran s plazmidima korištenim u transfekciji stanica. Pri svakoj analizi korištene su tri kontrole: kontrola 1 koja označava stanice koje nisu transficirane niti transducirane, kontrola 2 koja označava stanice koje su transducirane, ali nisu transficirane te kontrola 3 koja označava stanice koje su transficirane, ali nisu transducirane (Slika 16). Takve kontrole su neophodne za pravilno namještanje parametara analize uzoraka protočnom citometrijom kako bi se transficirane i/ili transducirane stanice mogle razlikovati od onih koje to nisu. Rezultati dobiveni protočnom citometrijom obrađeni su u programu FCS-Express. Primjer namještanja parametra pomoću kontrolnih uzoraka prikazan je na Slici 16. U odnosu na kontrolu 1 koja predstavlja stanice koje nisu transducirane niti transficirane, povećanje fluorescencije vidljivo je u pomaku histograma na desnu stranu. U slučaju detekcije korištenjem FL1 kanala koji detektira zelenu fluorescenciju vidljiv je pomak histograma kontrolnog uzorka 2 (transducirane stanice) u desnu stranu. Također, vidljivo je da u histogramu kontrolnog uzorka 3 (transficirane stanice) nema pomaka u desnu stranu pri detekciji zelene fluorescencije što je očekivano s obzirom da te stanice nisu transducirane. U slučaju detekcije korištenjem FL2 kanala koji detektira crvenu fluorescenciju vidljiv je pomak histograma kontrolnog uzorka 3 (transficirane stanice) u desnu stranu. U kontroli 2 nema pomaka u desnu stranu pri detekciji crvene fluorescencije što je očekivano s obzirom da te stanice nisu transficirane. Isto se može primijetiti na prikazu točkastog grafikona (engl. *Dot Plot*) kontrolnih uzoraka, u kojem pojedina točka prikazuje pojedinu analiziranu stanicu, a koji u obzir istovremeno uzima signale dobivene FL1 i FL2 detektorima. Linije su postavljene u odnosu na kontrolni uzorak 1. Zelenu fluorescenciju omeđuje okomita linija, a crvenu fluorescenciju omeđuje vodoravna linija. Sve stanice koje se nalaze desno od okomite linije smatraju se pozitivnima za zelenu fluorescenciju, a sve stanice koje se nalaze iznad vodoravne linije smatraju se pozitivnima na crvenu fluorescenciju. Iz prikaza točkastog grafikona kontrolnog uzorka 2 na Slici 16 vidljive su transducirane stanice i njihov povećan udio zelenih stanica u ukupnom broju analiziranih stanica uzorka prikazan desno od okomite linije, a iz točkastog grafikona kontrolnog uzorka 3 vidljiv je povećan udio crvenih stanica u ukupnom broju analiziranih stanica uzorka prikazan iznad vodoravne linije. Tip analize pomoću točkastog grafikona rezultate prikazuje sažeto i praktično te je odlučeno da se isti koristi za sve daljnje eksperimente.



**Slika 16.** Prikaz primjera namještanja parametara za analizu rezultata dobivenih pomoću protočne citometrije korištenjem kontrolnih uzoraka u programu FCS-Express. U prva dva reda prikazani su histogrami kontrole 1 (stanice koje nisu transficirane niti transducirane), kontrole 2 (transducirane stanice) i kontrole 3 (transficirane stanice). U prvom redu prikazani su histogrami koji prikazuju detektiranu zelenu fluorescenciju (FL1). U drugom redu prikazani su histogrami koji pokazuju detektiranu crvenu fluorescenciju (FL2). U trećem redu pokazani su točkasti grafikoni istih uzoraka koji istovremeno u obzir uzimaju i detektiranu crvenu i zelenu fluorescenciju, (FL1, FL2), gdje okomita linija omeđuje zelenu, a vodoravna linija crvenu fluorescenciju, dok postoci prikazuju udio stanica u pojedinom kvadrantu u ukupnom broju stanica uzorka.

Nakon uspješnog namještanja parametara, za svaki par Rab proteina napravljena je analiza transdukcije nakon transfekcije u tri biološke replike s dvije tehničke replike, a rezultati su prikazani kao reprezentativna biološka replika.

Iz Slike 17 vidljivo je da je u slučaju Rab5, Rab7 i Rab9 proteina uspješnost transdukcije niža u stanicama koje ekspimiraju DN verzije Rab proteina u odnosu na stanice koje ekspimiraju WT verzije Rab proteina, ali ne i u slučaju Rab11 gdje nema razlike WT i DN verzije. Ipak, potrebno je naglasiti da samo Rab9 ima statistički značajno smanjenje uspješnosti transdukcije u stanicama koje ekspimiraju Rab9 DN u odnosu na Rab9 WT.



**Slika 17.** Prikaz udjela uspješno transduciranih stanica prethodno transficiranih s a) DsRed-Rab5 WT plazmidom i DsRed-Rab5 DN plazmidom; b) s DsRed-Rab7 WT plazmidom i DsRed-Rab7 DN plazmidom; c) s DsRed-Rab9 WT plazmidom i DsRed-Rab9 DN plazmidom;

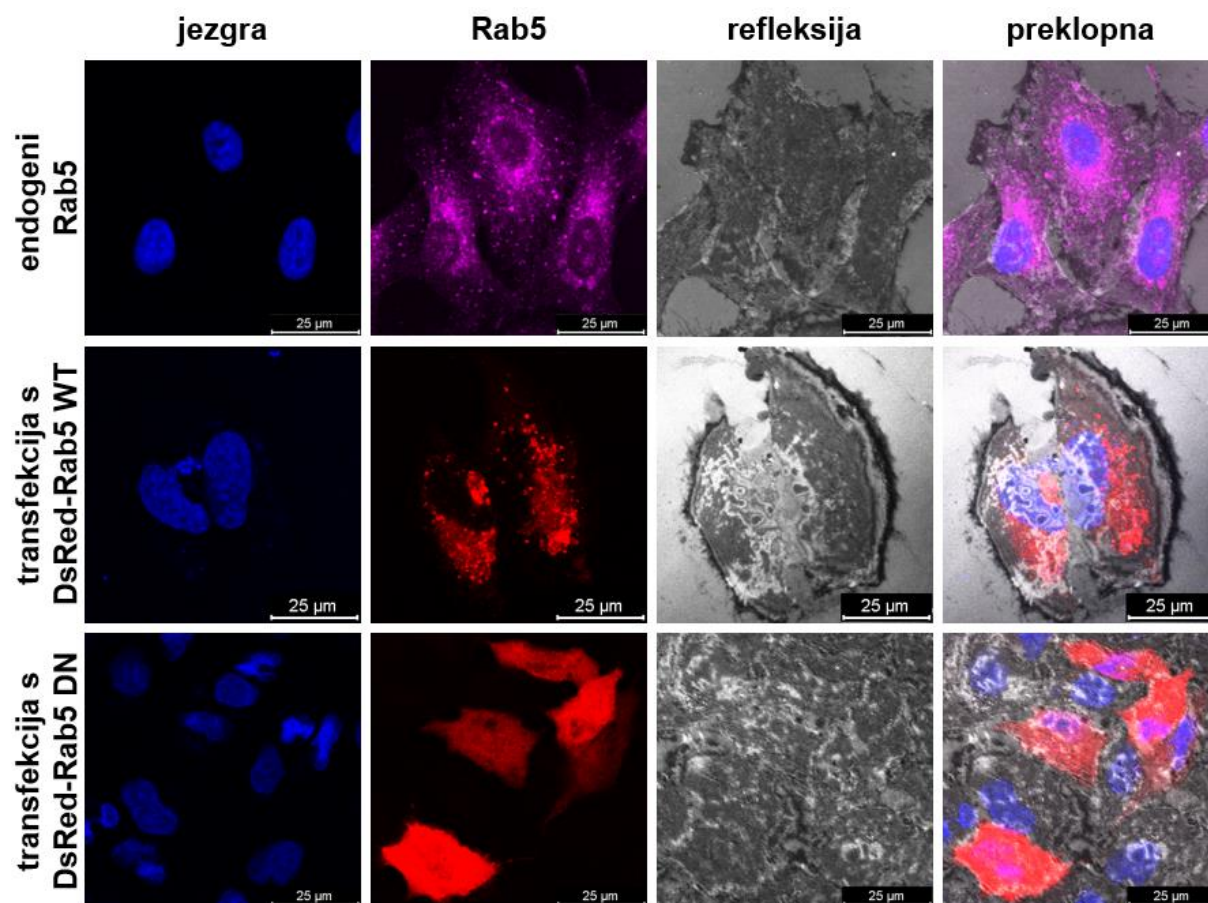
d) s DsRed-Rab11 WT plazmidom i DsRed-Rab11 DN plazmidom. Rezultati su prikazani kao postotak transduciranih stanica određen kao postotak stanica s detektiranom povećanom zelenom fluorescencijom.

#### **4.5. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI TRANDUKCIJE S HAdV-D26 KONFOKALNOM MIKROSKOPIJOM NAKON TRANSFEKCIJE S DsRed-Rab PLAZMIDIMA**

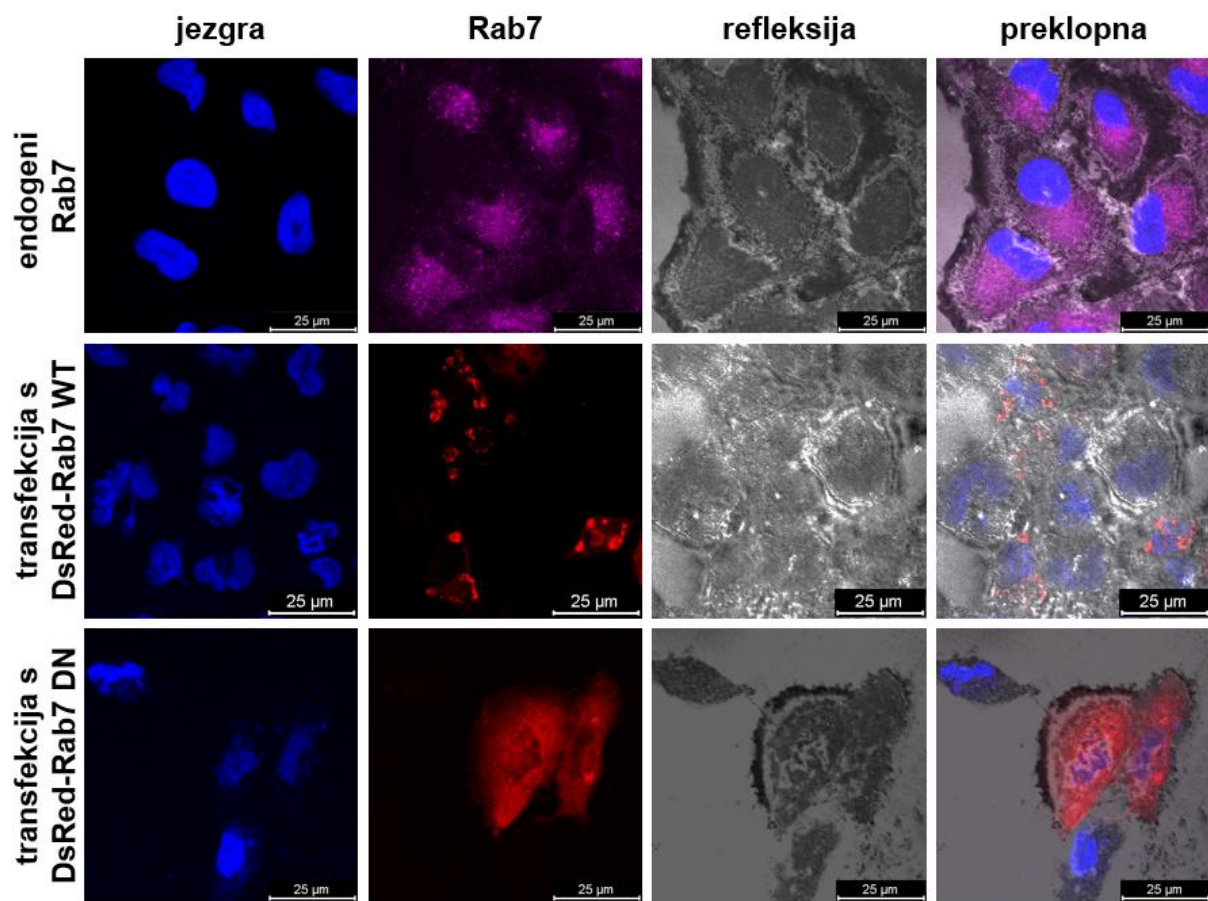
Da bi se potvrdili rezultati dobiveni protočnom citometrijom, kao druga metoda za određivanje uspješnosti transdukcije s HAdV-D26 nakon transfekcije s DsRed-Rab plazmidima korištena je konfokalna mikroskopija.

Prvotno je metodom imunofluorescencije uspoređen signal endogenih Rab proteina s Rab proteinima unešenih transfekcijom plazmida. Imunofluorescencija omogućuje vizualizaciju proteina korištenjem fluorescentnih protutijela specifičnih za te proteine. Nakon transfekcije stanica uzgojenih na stakalcima u pločicama za uzgoj stanica s 24 bunarića proveden je postupak pripreme za imunofluorescenciju opisan u poglavlju 3.2.5. Uzorci su analizirani konfokalnom mikroskopijom. Signal endogenog Rab proteina obilježenog fluorescentnom bojom AF647 (ljubičasti kanal), uspoređen je sa signalom Rab proteina unešenih transfekcijom WT ili DN verzija plazmida. Slika 18 pokazuje da su endogeni Rab5 te Rab5 WT smješteni najviše u perinuklearnom području, ali je primjećeno da su i raspršeni u stanicama u zrnastim nakupinama, što je vjerojatno njihov signal kad su aktivirani. Naime, zrnati signal i njegova veličina upućuju na aktivirane Rab proteine ugrađene u membrane endosoma. Suprotno od njih, Rab5 DN proteini ravnomjerno su raspršeni po citoplazmi, to jest ne nalaze se na mjestima djelovanja zbog nemogućnosti aktivacije od strane GEF i posljedično efektoru Rab proteina. Rezultati dobiveni analizom endogenih, WT i DN Rab5 (Slika 18) Rab7 (Slika 19), Rab9 (Slika 20) i Rab11 proteina (Slika 21) pokazali su sličan uniformno raspršeni signal što se tiče Rab DN verzije proteina. U odnosu na endogeni Rab5, endogeni Rab7 i Rab9 su nešto manje raspršeni u zrnatim nakupinama, a više se nalaze u perinuklearnom području. I dok se Rab9 WT signal poklapa sa signalom endogenog Rab9, kod Rab7 WT ima razlika u odnosu na endogeni Rab7. Naime, Rab7 WT nalazi se u manjem broju većih nakupina u citoplazmi. Endogeni Rab11 je jednoliko raspršen po citoplazmi uz primjetno jače nakupljenje u većoj točki u perinuklearnom području. Rab11 WT ima sličan signal, samo što se kod njega velika većina signala nalazi u većoj točki u

perinuklearnom području, a u većini transficiranih stanica gotovo da uopće nije raspršen po ostatku citoplazme.

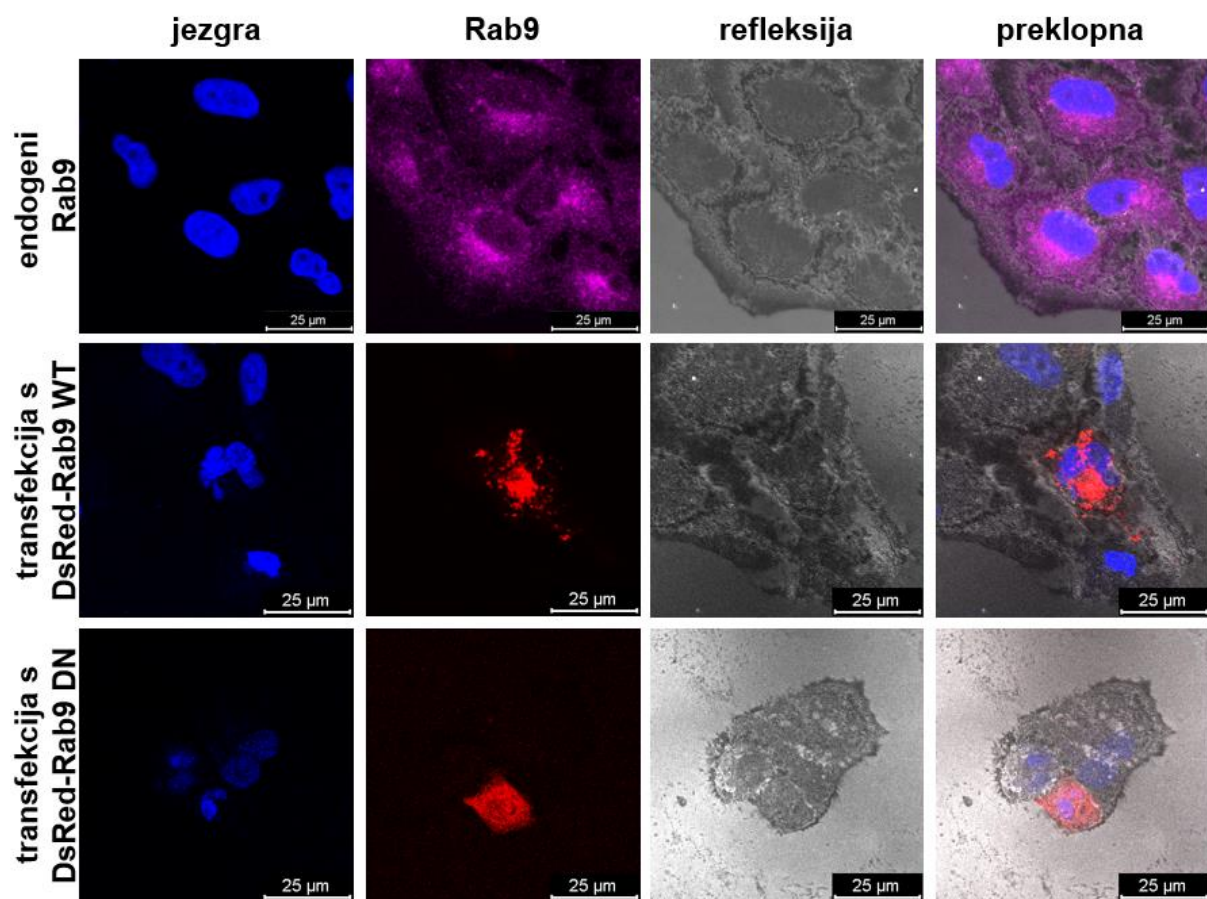


**Slika 18.** Signali Rab5, Rab5 WT i Rab5 DN proteina dobiveni konfokalnom mikroskopijom. U svakom redu prikazano je jedno vidno polje snimano kroz različite kanale: signal jezgre, signal Rab5 proteina, refleksija te preklopna slika. Prvi red prikazuje signal endogenog Rab5 proteina obilježenog Rab5-specifičnim protutijelom. Drugi red prikazuje signal Rab5 WT proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab5 WT plazmidom. Treći red prikazuje signal Rab5 DN proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab5 DN plazmidom.

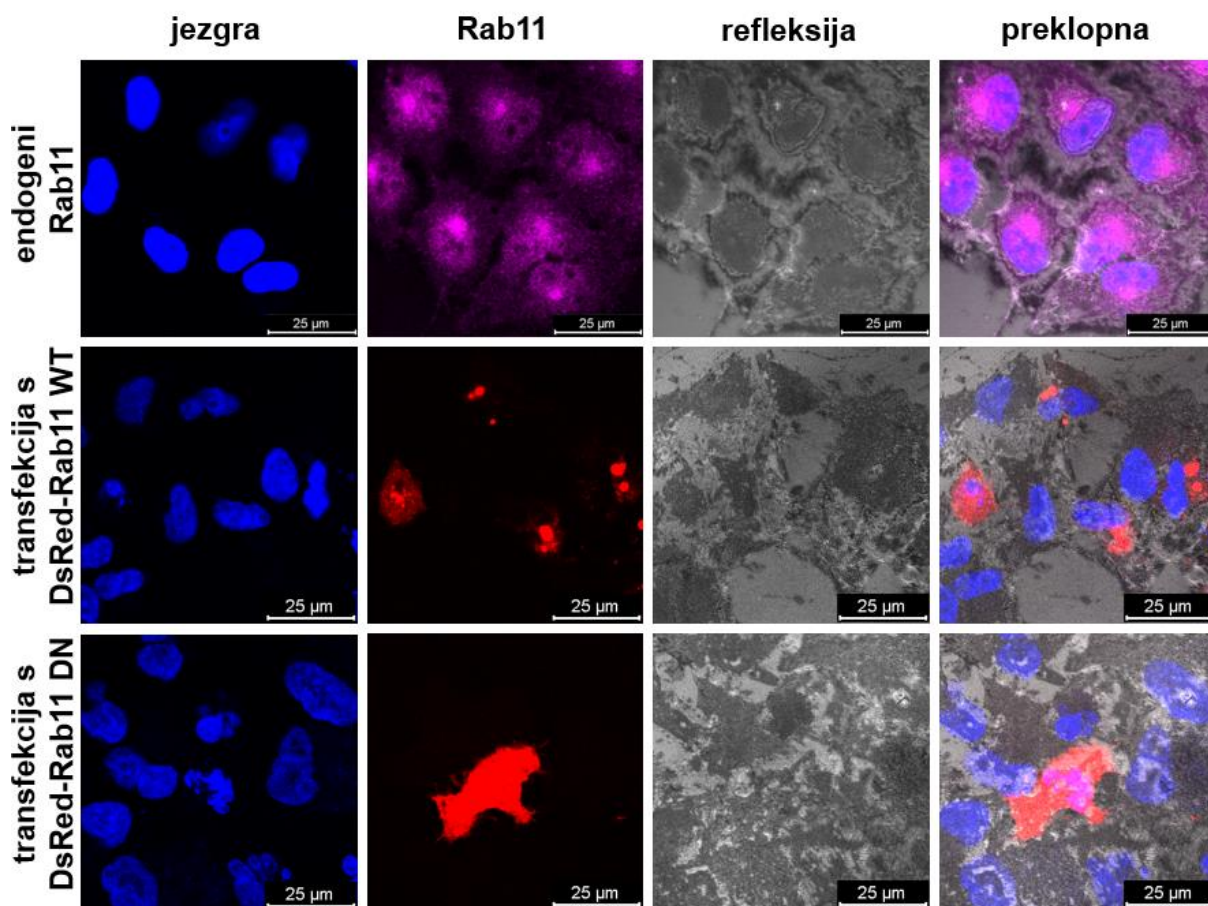


**Slika 19.** Signali Rab7, Rab7 WT i Rab7 DN proteina dobiveni konfokalnom mikroskopijom. U svakom redu prikazano je jedno vidno polje snimano kroz različite kanale: signal jezgre, signal Rab5 proteina, refleksija te preklopna slika. Prvi red prikazuje signal endogenog Rab7 proteina obilježenog Rab7-specifičnim protutijelom. Drugi red prikazuje signal Rab7 WT proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab7 WT plazmidom. Treći red prikazuje signal Rab7 DN proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab7 DN plazmidom.





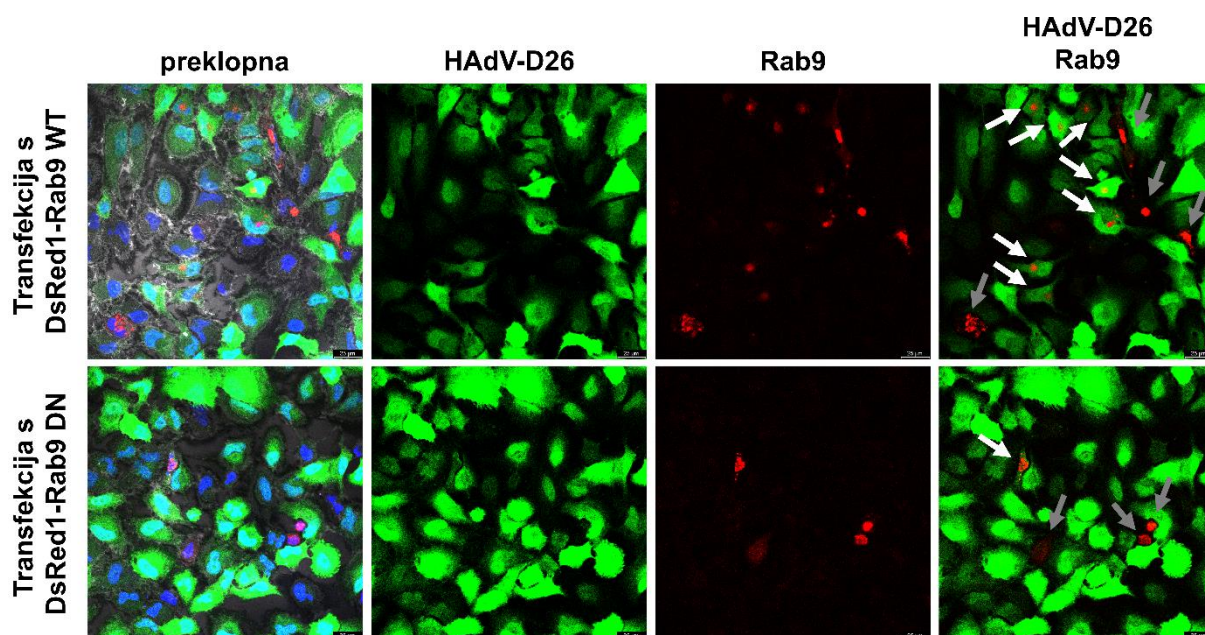
**Slika 20.** Signali Rab9, Rab9 WT i Rab9 DN proteina dobiveni konfokalnom mikroskopijom. U svakom redu prikazano je jedno vidno polje snimano kroz različite kanale: signal jezgre, signal Rab9 proteina, refleksija te preklopna slika. Prvi red prikazuje signal endogenog Rab9 proteina obilježenog Rab9-specifičnim protutijelom. Drugi red prikazuje signal Rab9 WT proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab9 WT plazmidom. Treći red prikazuje signal Rab9 DN proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab9 DN plazmidom.



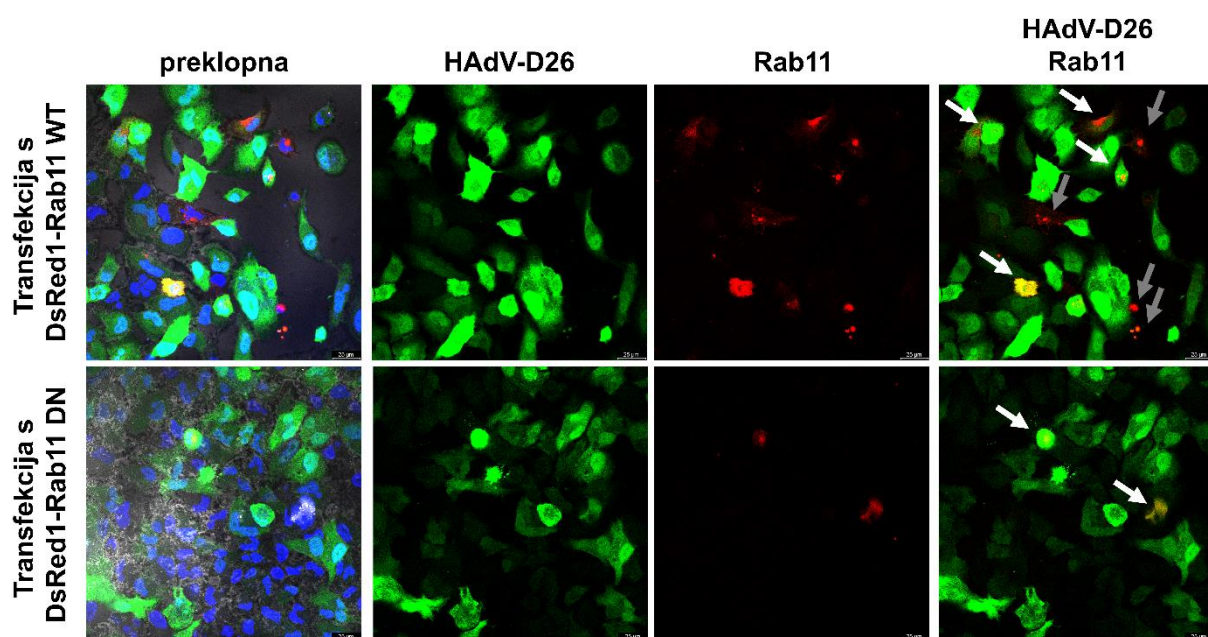
**Slika 21.** Signali Rab11, Rab11 WT i Rab11 DN proteina dobiveni konfokalnom mikroskopijom. U svakom redu prikazano je jedno vidno polje snimano kroz različite kanale: signal jezgre, signal Rab11 proteina, refleksija te preklopna slika. Prvi red prikazuje signal endogenog Rab11 proteina obilježenog Rab11-specifičnim protutijelom. Drugi red prikazuje signal Rab11 WT proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab11 WT plazmidom. Treći red prikazuje signal Rab11 DN proteina u stanicama transficiranim DsRed-Rab11 DN plazmidom.

S obzirom da je protočnom citometrijom pokazano da Rab9 DN značajno smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV-D26 u odnosu na Rab9 WT, dok samo za Rab11 WT i DN par nema nikakve razlike u uspješnosti transdukcije (Slika 17), za Rab9 i Rab11 proteine određena je uspješnost transdukcije nakon transfekcije konfokalnom mikroskopijom u svrhu dodatne analize. Postupak transfekcije i transdukcije opisan je u poglavljima 3.2.3. i 3.2.4. Korišteni su uvjeti u kojima je oko 90 % stanica bilo transducirano, a rezultati su prikazani na Slikama 22 i 23. Iz rezultata je vidljivo da je transfekcija slabija nego uobičajeno, osobito za DN verzije Rab proteina. Nažalost, broj transficiranih stanica bio je premali da bi se napravila statistička analiza,

a također signal Rab WT i DN proteina nije sukladan prethodno pokazanim rezultatima prikazanima na Slikama 20 i 21. Stoga je ovaj eksperimentalni pristup potrebno ponoviti.



**Slika 22.** Rezultati konfokalne mikroskopije stanica transficiranih sa DsRed1-Rab9 WT/DN plazmidima i transduciranih sa HAdV-D26. U svakom redu pokazano je jedno vidno polje snimano kroz četiri kanala; preklopna slika koja obuhvaća signal jezgre, signal HAdV-D26 i signal Rab9 WT/DN proteina, signal HAdV-D26, signal Rab9 WT /DN te preklopna slika signala HAdV-D26 i Rab9 WT/DN proteina. Bijele strelice pokazuju transducirane transficirane stanice, a sive strelice pokazuju transficirane stanice koje nisu transducirane.



**Slika 23.** Rezultati konfokalne mikroskopije stanica transficiranih sa DsRed1-Rab11 WT/DN plazmidima i transduciranih sa HAdV-D26. U svakom redu pokazano je jedno vidno polje snimano kroz četiri kanala; preklopna slika koja obuhvaća signal jezgre, signal HAdV-D26 i signal Rab11 WT/DN proteina, signal HAdV-D26, signal Rab11 WT /DN te preklopna slika signala HAdV-D26 i Rab11 WT/DN proteina. Bijele strelice pokazuju transducirane transficirane stanice, a sive strelice pokazuju transficirane stanice koje nisu transducirane.

U dosadašnjim istraživanjima unutarstaničkog putovanja adenovirusa uglavnom je istražena kolokalizacija pojedinog tipa adenovirusa s efektorima Rab proteina: EEA1 (efektor Rab5) te LAMP-1 (efektor Rab7 i Rab9), ali ima podataka i o kolokalizaciji s Rab proteinima te je određena i promjena u uspješnosti infekcije korištenjem Rab5 DN. Tako je pokazano da se HAdV-D26 i HAdV-B35 nakupljaju u kasnim endosomima A549 stanica, što je dokazano kolokalizacijom s LAMP-1, efektorom kasnih endosoma (Teigler i sur., 2014). Djelomičnu kolokalizaciju s LAMP-1 pokazuje i HAdV-B7 koji se nakuplja u lizosomima koji su Rab7 pozitivni (Myazawa i sur.,2001). Za razliku od njih, HAdV-C2 i -C5 izlaze već iz ranih endosoma koji su pozitivni na EEA1 (Gastadelli i sur., 2008), a njihov unos je smanjen u slučaju ekspresije Rab5 DN proteina u odnosu na Rab5 WT što upućuje na ulogu Rab5 u unutarstaničnom putovanju HAdV-C2 i C5. HAdV-D37 ulazi u stanice rožnice oka čovjeka putem koji je neovisan o EEA1, a ovisan o LAMP1 (Lee i sur., 2020). HAdV-G41 se zadržava u vezikulama koje se nalaze u blizini stanične membrane i koje ne pokazuju kolokalizaciju s LAMP-1 (Leung i Brown, 2011).

U ovom istraživanju uočeno je da je u stanicama koje su bile transficirane plazmidima koji kodiraju za DN Rab5, -7 i -9 došlo do smanjenja uspješnosti transdukcije HAdV-D26, u odnosu na stanice transficirane plazmidima koji kodiraju za WT formu tih istih Rab proteina. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je za uspješnu transdukciju s HAdV-D26 potrebno prisustvo funkcionalnih ranih i kasnih endosoma, odnosno da HAdV-D26 tijekom svog unutarstaničnog putovanja prolazi kroz endosome koji sadrže Rab5, -7 i -9. Uloga funkcionalnog Rab5 proteina je posredovanje odvajanja endosomske vezikule od membrane i spajanja s ranim endosomom. U slučaju proteina Rab5 DN može se pretpostaviti da je transdukcija HAdV-D26 smanjena zbog zadržavanja virusa u endosomskoj vezikuli ili ranom endosomu. (Rauma i sur., 1999). U slučaju Rab7 DN proteina pretpostavlja se da je stupanj transdukcije smanjen zbog izostanka

zakiseljavanja kasnog endosoma. Snižavanje pH u kasnom endosomu primarna je uloga funkcionalnog Rab7 proteina koja omogućuje raspadanje kapside i oslobađanje adenovirusnog proteina VI. Oslobađanje proteina VI dovodi do pucanja membrane kasnog endosoma i izlaska adenovirusa iz endosoma u citoplazmu. (Wiethoff i sur., 2005). Protein Rab9 ima ulogu u zakiseljavanju endosoma i stvaranju transportnih vezikula interakcijom sa proteinom TIP47. U odsustvu interakcije proteina Rab9 i TIP47 adenovirus u kasnom endosomu usmjeren je prema lizosomu. Pretpostavlja se da je stupanj transdukcije u slučaju Rab9 DN proteina smanjen zbog nemogućnosti stvaranja transportnih vezikula (Ploen i sur., 2013).

Također, nije došlo do promjene u uspješnosti transdukcije s HAdV-D26 u stanicama koje su eksprimirale Rab11 DN u odnosu na Rab11 WT što upućuje na to da Rab11 nema ulogu u unutarstaničnom putovanju HAdV-D26. Pritom, primarna uloga Rab11 u stanici jest regulacija putovanja perinuklearnih reciklirajućih endosoma i regulacija recikliranja internaliziranih receptora egzocitozom (Campa i Hirsch, 2017).

U uvjetima lošije transfekcije u stanicama utjecaj Rab DN formi je slab zbog prisustva funkcionalnih staničnih Rab proteina kodiranih genomom stanica. Moguće je da bi utjecaj Rab DN proteina na HAdV-D26 uspješnost transdukcije bio puno jači u slučaju uspješnije transfekcije.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Uspostavljen je model za istraživanje uloge proteina Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11 u uspješnosti transdukcije s HAdV-D26 i optimizirana transfekcija koja osigurava uspješnost transfekcije A549 stanica od oko 30 % na stakalcima i 60 % na plastici za uzgoj stanica.
2. Dominantno negativni mutanti Rab5, Rab7 i osobito Rab9 smanjuju uspješnost transdukcije s HAdV-D26 što upućuje na ulogu proteina Rab5, Rab7 i Rab9 u unutarstaničnom putovanju HAdV-D26, odnosno zaključak da je za uspješnu transdukciju s HAdV-D26 važan njegov prolazak kroz rane i kasne endosome.
3. Dominantno negativni mutant Rab11 nema utjecaj na uspješnost transdukcije s HAdV-D26 pa je moguće zaključiti da reciklirajući endosomi nisu uključeni u put infekcije HAdV-D26.

## 6. LITERATURA

Abbink P, Lemckert AA, Ewald BA, Lynch DM, Denholtz M, Smits S, i sur. (2007) Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *Journal of virology*, **81**, 4654–J4663. <https://doi.org/10.1128/JVI.02696-06>

Acevedo JM, Hoermann B, Schlimbach T (2018) Changes in global translation elongation or initiation rates shape the proteome via the Kozak sequence. *Sci Rep* **8**, 4018 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22330-9>

AddGene Vector Database, pDsRed2-C1, Pristupljeno 28.6.2022. [https://www.addgene.org/vector-database/query/?q\\_vdb=pDsRed2-C1](https://www.addgene.org/vector-database/query/?q_vdb=pDsRed2-C1)

Afkhami S, Zhou X, Yao Y (2016) Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens. *Molecular therapy. Methods & clinical development*. **3**. 16030. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.30>

Amorim MJ, Bruce EA, Read EKC, Foeglein A, Mahen R, Stuart AD, Digard P (2011) A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA. *Journal of Virology*, **85**, 4143–4156. <https://doi.org/10.1128/jvi.02606-10>

Anderson R, Haskell R, Xia H (2000) A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther.* **7**, 1034–1038 <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301197>

Appaiahgari MB, Vrati S (2014) Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **15**, 337–351. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.993374>

Arnberg N (2009) Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Reviews in Medical Virology*, **19**, 165–178. <https://doi.org/10.1002/rmv.612>

Arnberg, N (2012) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends in Pharmacol Sci.* **33**, 443-444. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.005>

Baker AT, Greenshields-Watson A, Coughlan L, Davies JA, Uusi-Kerttula H, Cole DK, Parker AL (2019) Diversity within the adenovirus fiber knob hypervariable loops influences primary

receptor interactions. *Nature communications*, **10**, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08599-y>

Baker AT, Mundy RM, Davies JA, Rizkallah PJ, Parker AL (2019) Human adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cell entry receptor. *Science Advances*, **5**, 3567. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3567>

Baker, AT, RM Mundy, JA Davies, PJ Rizkallah and AL Parker (2019), Human adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cellentry receptor." *Sci Adv* **5**(9): eaax3567 <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3567>

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. (2009). Integrins. *Cell and Tissue Research*, **339**, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>

Barry MA, Rubin JD, Lu S (2020) Retargeting Adenoviruses for Therapeutic Applications and Vaccines. *FEBS Letters*. **594**, 1918-1946 <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13731>

Berclaz PY, Zsengellér Z, Shibata Y, Otake K, Strasbaugh S, Whitsett JA, Trapnell BC (2002) Endocytic internalization of adenovirus, nonspecific phagocytosis, and cytoskeletal organization are coordinately regulated in alveolar macrophages by GM-CSF and PU. 1. *The Journal of Immunology*, **169**, 6332-6342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6332>

Campa CC, Hirsch E (2017) Rab11 and phosphoinositides: A synergy of signal transducers in the control of vesicular trafficking. *Advances in Biological Regulation*, **63**, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.09.002>

Brighthouse A, Dacks J. B, Field MC (2010) Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *CMLS*, **67**, 3449–3465. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0436-1>

Burmeister WP, Guilligay D, Cusack S, Wadell G, Arnberg N (2004) Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. *Journal of virology*, **78**, 7727-7736. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7727-7736.2004>

Cardarelli F, Digiacomo L, Marchini C, (2016) The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci Rep*. **6**, 25879 . <https://doi.org/10.1038/srep25879>



Chailertvanitkul VA, Pouton CW (2010) Adenovirus: a blueprint for non-viral gene delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 627–632. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.06.011>

Charman M, Herrmann C, Weitzman MD (2019) Viral and Cellular Interactions During Adenovirus DNA Replication. *FEBS Letters*. **593**, 3531-3550 <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13695>

Chen RF, Lee CY (2013) Adenoviruses Types, Cell Receptors and Local Innate Cytokines in Adenovirus Infection. *International Reviews of Immunology*, **33**, 45–53. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.823420>

Chen X, Varki A (2010) Advances in the Biology and Chemistry of Sialic Acids. *ACS Chemical Biology*, **5**, 163–176. <https://doi.org/10.1021/cb900266r>

Choudhury A, Dominguez M, Vishwajeet P, Sharma, D, Narita K, Wheatley C, Marks D, Pagano R (2002) Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *The Journal of clinical investigation*. **109**. 1541-50. <https://doi.org/10.1172/JCI15420>.

Custers J, Kim D, Leyssen M, Gurwith M, Tomaka F, Robertson J, (2021) Vaccines based on replication incompetent Ad26 viral vectors: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*, **39**, 3081-3101. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.09.018>

Day PM, Thompson CD, Schowalter RM, Lowy DR, Schiller JT (2013) Identification of a Role for the trans-Golgi Network in Human Papillomavirus 16 Pseudovirus Infection. *Journal of Virology*, **87**, 3862–3870. <https://doi.org/10.1128/jvi.03222-12>

Douglas, JT (2007) Adenoviral vectors for gene therapy. *Molecular Biotechnology*, **36**, 71–80. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0021-5>

Echavarría, M (2008) Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clinical microbiology reviews*, **21**, 704–715. <https://doi.org/10.1128/CMR.00052-07>

European Commission (2020), Vaccine against Ebola: Commission grants new market authorisations. Pristupljeno 10. lipnja 2022. [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP\\_20\\_1248](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_20_1248)

European Commission (2021), European Commission authorises fourth safe and effective vaccine against COVID-19. *Pristupljeno* 10. lipnja 2022. [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip\\_21\\_1085](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_21_1085)

Excoffon KJDA (2020) The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor: Virological and Biological Beauty. *FEBS Letters*. **594**, 1828-1837. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13794>

Ferro E, Bosia C, Campa CC (2021) RAB11-Mediated Trafficking and Human Cancers: An Updated Review. *Biology*, **10**, 26. <https://doi.org/10.3390/biology10010026>

Gallardo J, Pérez-Illana M, Martín-González N and San Martín C (2021) Adenovirus Structure: What Is New? *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 5240 <http://doi.org/10.3390/ijms22105240>

Gastaldelli M, Imelli N, Boucke K, Amstutz B, Meier O, Greber UF (2008) Infectious adenovirus type 2 transport through early but not late endosomes. *Traffic*, **9**, 2265–2278. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00835.x>

Goody R, Müller M, Wu Y (2017) Mechanisms of action of Rab proteins, key regulators of intracellular vesicular transport. *Biological Chemistry*, **398**, 565-575. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0274>

Greber UF (2020) Adenoviruses – Infection, pathogenesis and therapy. *FEBS Letters*. **594**, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13849>

Greber UF, Flatt JW (2019). Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. *Annual Review of Virology*, **6**. 177-197. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015550>

Greber UF, Suomalainen M, Stidwill RP, Boucke K, Ebersold MW, Helenius A (1997) The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *The EMBO journal*, **16**, 5998-6007. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5998>

Grosshans BL, Ortiz, D, Novick P (2006) Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 11821–11827. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601617103>

Haucke V, Kozlov MM (2018). Membrane remodeling in clathrin-mediated endocytosis. *Journal of cell science*, **131**, 216812. <https://doi.org/10.1242/jcs.216812>

- Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, Kuryk L, Lipiec A, Greber UF (2014) Innate Immunity to Adenovirus. *Human Gene Therapy*, **25**, 265–284. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.001>
- Hilleman MR, Werner JH (1954) Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* **85**: 183-188. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20825>
- Homma Y, Hiragi S, Fukuda M. (2020) Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *The FEBS Journal*. **288**, 36-55. <https://doi.org/10.1111/febs.15453>
- Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *The EMBO Journal*, **30**, 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- HZ Chen, Q Xiang, Y Li, RK Kurupati, B Jia, A Bian, DM Zhou, N Hutnick, SYuan, C Gray, J Serwanga, B Auma, P Kaleebu, X Zhou, MR Betts and HC Ertl, (2010), Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from threespecies of adenoviridae, *J Virol* **84**(20): 10522-10532, <https://doi.org/10.1128/JVI.00450-10>
- Johns HL, Berryman S, Monaghan P, Belsham GJ, Jackson T (2009) A Dominant-Negative Mutant of rab5 Inhibits Infection of Cells by Foot-and-Mouth Disease Virus: Implications for Virus Entry. *Journal of Virology*, **83**, 6247–6256. <https://doi.org/10.1128/jvi.02460-08>
- Kaksonen M, Roux A (2018) Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, **19**, 313-326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
- Kalia M, Khasa R, Sharma M, Nain M, Vrati S (2012) Japanese Encephalitis Virus Infects Neuronal Cells through a Clathrin-Independent Endocytic Mechanism. *Journal of Virology*, **87**, 148–162. <https://doi.org/10.1128/jvi.01399-12>
- Kelly EE, Horgan CP, Goud B, McCaffrey MW (2012) The Rab family of proteins: 25 years on. *Biochemical Society Transactions*, **40**, 1337–1347. <https://doi.org/10.1042/bst20120203>
- Kreppel F, Hagedorn C, (2021) Capsid and Genome Modification Strategies to Reduce the Immunogenicity of Adenoviral Vectors International. *Journal of Molecular Sciences*, **22**, 2417 <https://doi.org/10.3390/ijms22052417>.
- Kulanayake S, Tikoo S (2021) Adenovirus Core Proteins: Structure and Function. *Viruses*. **13**, 388. <http://dx.doi.org/10.3390/v13030388>.

- Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, He TC (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. doi:10.1016/j.gendis.2017.04.001
- Lee JS, Mukherjee S, Lee JY, Saha A, Chodosh J, Painter DF, Rajaiya J (2020) Entry of Epidemic Keratoconjunctivitis-Associated Human Adenovirus Type 37 in Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **61**, 50. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.10.50>
- Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB (2018) Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* **46**, D708–D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Leopold PL, Crystal RG (2007) Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Advanced drug delivery reviews*, **59**, 810–821, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.007>
- Leopold PL, Pfister KK (2006) Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. *Traffic*, **7**, 516–523. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00408.x>
- Lesueur L, Mir L, Andre F (2016) Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. **5**. e291. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.4>.
- Leung TKH, Brown M (2011) Block in entry of enteric adenovirus type 41 in HEK293 cells. *Virus Research*, **156**, 54–63. doi:10.1016/j.virusres.2010.12.01
- Li Y (2010) Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **55**, 73–83. <https://doi.org/10.1042/ba20090273>
- Lindsay AJ, Hendrick AG, Cantalupo G, Senic-Matuglia F, Goud B, Bucci C, McCaffrey MW (2002) Rab Coupling Protein (RCP), a Novel Rab4 and Rab11 Effector Protein. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 12190–12199. <https://doi.org/10.1074/jbc.m108665200>
- Liszewski MK, Kemper C (2019) Complement in Motion: The Evolution of CD46 from a Complement Regulator to an Orchestrator of Normal Cell Physiology. *The Journal of Immunology*, **203**, 3–5. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900527>

- Liu CC, Zhang YN, Li ZY, Hou JX, Zhou J, Kan L, Chen PY (2017) Rab5 and Rab11 Are Required for Clathrin-Dependent Endocytosis of Japanese Encephalitis Virus in BHK-21 Cells. *Journal of Virology*, **91**. <https://doi.org/10.1128/jvi.01113-17>
- Maier O, Marvin SA, Wodrich H, Campbell EM, Wiethoff CM (2012) Spatiotemporal dynamics of adenovirus membrane rupture and endosomal escape. *Journal of virology*, **86**, 10821-10828. <https://doi.org/10.1128/JVI.01428-12>
- Majhen D (2022) Human adenovirus type 26 basic biology and its usage as vaccine vector. *Reviews in medical virology*, 2338. <https://doi.org/10.1002/rmv.2338>
- Majhen D, Calderon H, Chandra N, Fajardo CA, Rajan A, Alemany R, Custers J (2014) Adenovirus-Based Vaccines for Fighting Infectious Diseases and Cancer: Progress in the Field. *Human Gene Therapy*, **25**, <https://doi.org/10.1089/hum.2013.235>
- Majhen D, Nemet J, Richardson J, Gabrilovac J, Hajsig M, Osmak M, Ambriović-Ristov A (2009) Differential role of  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  integrins in internalization and transduction efficacies of wild type and RGD4C fiber-modified adenoviruses. *Virus research*, **139**, 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.004>
- Mennechet FJD, Paris O, Ouoba AR, Salazar Arenas S, Sirima SB, Takoudjou Dzomo GR, Kremer EJ (2019) A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. *Expert Review of Vaccines*, **18**, 1–17. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1588113>
- Mercer J, Helenius A (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology*, **11**, 510-520. <https://doi.org/10.1038/ncb0509-510>
- Mercer J, Schelhaas M, Helenius A (2010) Virus Entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, **79**, 803–833. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-104626>
- Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL (2018) Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annual review of biochemistry*, **87**, 871-896. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012644>
- Mire CE, White JM, Whitt MA (2010) A Spatio-Temporal Analysis of Matrix Protein and Nucleocapsid Trafficking during Vesicular Stomatitis Virus Uncoating. *PLoS Pathogens*, **6**, e1000994. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000994>

- Mittereder N, March KL, Trapnell BC (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *Journal of virology*, **70**, 7498–7509. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.11.7498-7509.1996>
- Miyazawa, N, Crystal RG, Leopold PL (2001) Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. *J Virol* **75**, 1387-1400. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1387-1400.2001>
- Nemerow GR (2000) Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology*, **274**, 1-4. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0468>
- Nestić D, Božinović K, Pehar I, Wallace R, Parker AL, Majhen D, (2021) The Revolving Door of Adenovirus Cell Entry: Not All Pathways Are Equal. *Pharmaceutics* **13**, 1585. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101585>
- Nestić D, Uil TG, Ma J, Roy S, Vellinga J, Baker AH, Majhen D (2019)  $\alpha\beta 3$  Integrin is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26. *Journal of Virology*. **93**, e01474-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.01474-18>
- Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biology*, **1**, 376–382. <https://doi.org/10.1038/14075>
- Pelkmans L, (2005) Secrets of caveolae-and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1746**, 295-304. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.06.009>
- Pelkmans L, Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*, **3**, 311-320. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x>
- Pennington MR, Saha A, Painter DF, Gavazzi C, Ismail AM, Zhou X, Rajaiya J i sur., (2019) Disparate Entry of Adenoviruses Dictates Differential Innate Immune Responses on the Ocular Surface. *Microorganisms*, **7**, 351. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090351>
- Pereira-Leal JB, Seabra MC (2001) Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, **313**, 889–901. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5072>

- Persson BD, John L, Rafie K, Strebl M, Frångsmyr L, Ballmann MZ, Arnberg N (2021) Human species D adenovirus hexon capsid protein mediates cell entry through a direct interaction with CD46. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **118**, e2020732118. <https://doi.org/>
- Pied N, Wodrich H. (2019). Imaging the Adenovirus infection cycle. *FEBS Letters*. **593**, 3419-3448, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13690>
- Piedade D, Azevedo-Pereira, J (2017) MicroRNAs as Important Players in Host–Adenovirus Interactions. *Frontiers in Microbiology*. **8**. 1324. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01324>.
- Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Schille SA, Biniossek ML, Baumert TF i sur. (2013) TIP47 is associated with the Hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles. *European Journal of Cell Biology*, **92**, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.12.003>
- Quirin K, Eschli B, Scheu I, Poort L, Kartenbeck J, Helenius, A (2008) Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology*, **378**, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.046>
- Rauma T, Tuukkanen J, Bergelson JM, Denning G, Hautala T (1999) Rab5 GTPase regulates adenovirus endocytosis. *Journal of virology*, **73**, 9664–9668. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.11.9664-9668.1999>
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical journal*, **377**, 159-169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**: 570-573. <https://doi.org/10.3181/00379727-84-20714>
- Russell W, (2000) Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*, **81**, 2573–2604. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2573>
- Russell W, (2009) Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* **90**: 1-20. The Journal of general virology. <https://doi.org/10.1099/vir.0.003087-0>.
- Rux JJ, Burnett RM (2004) Adenovirus Structure. *Human Gene Therapy*, **15**, 1167–1176. <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.1167>

Saha B, Wong C, Parks R (2014) The Adenovirus Genome Contributes to the Structural Stability of the Virion, *Viruses*, **6**, 3563–3583. <https://doi.org/10.3390/v6093563>.

San Martín C (2012) Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses* **4**, 847–877. <https://doi.org/10.3390/v4050847>

Saraf S, Saraf J, Pooja H, Jain S (2016) Topotecan Liposomes (TLs): A Visit From Molecular To Therapeutic Platform. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. **33**. 401-432 <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016015926>.

Schauer R (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal*, **17**, 485-499.

Scherer J, Vallee RB (2011) Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon. *Viruses*, **3**, 1417-1431. <https://doi.org/10.3390/v3081417>

Scherer J, Yi J, Vallee RB (2020) Role of Cytoplasmic Dynein and Kinesins in Adenovirus Transport. *FEBS Letters*. **594**, 1838-1847. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13777>

Sharma DK, Choudhury, A, Singh RD, Wheatley, CL, Marks DL, Pagano RE (2003) Glycosphingolipids Internalized via Caveolar-related Endocytosis Rapidly Merge with the Clathrin Pathway in Early Endosomes and Form Microdomains for Recycling. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 7564-7572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210457200>

Singh S, Singh K, Babita R (2018) Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects. *Adenoviruses*, **53**, 53-91, <https://doi.org/0.5772/intechopen.79697>.

Spearman P (2017) Viral interactions with host cell Rab GTPases. *Small GTPases*, **9**, 192–201. doi:10.1080/21541248.2017.134655

Stasiak AC, Stehle T (2019) Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view. *Medical Microbiology and Immunology*. **209**, 325–333 <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00645-2>



- Stein MP, Dong J, Wandinger-Ness A (2003) Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, 1421–1437. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.07.009>
- Strunze S, Engelke MF, Wang IH, Puntener D, Boucke K, Schleich S, Greber UF i sur. (2011) Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell host & microbe*, **10**, 210-223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.010>
- Takagi J (2004) Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochemical Society Transactions*, **32**, 403-406. <https://doi.org/10.1042/BST0320403>
- Teigler JE, Kagan JC, Barouch DH (2014) Late Endosomal Trafficking of Alternative Serotype Adenovirus Vaccine Vectors Augments Antiviral Innate Immunity. *Journal of Virology*, **88**, 10354–10363. <https://doi.org/10.1128/jvi.00936-14>
- Van der Flier A, Sonnenberg A (2001) Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*, **305**, 285–298. <https://doi.org/10.1007/s004410100417>
- Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(8), 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.06.002>
- Vogels R, Zuijdgheest D, van Rijnsoever R, Hartkoorn E, Damen I, de Bethune MP, 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. *Journal of Virology*, **77**, 8263–8271. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.15.8263-8271.2003>
- Volpers C, Kochanek S (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The Journal of Gene Medicine*, **6**, 164–171. <https://doi.org/10.1002/jgm.496>
- Wandinger-Ness A, Zerial M (2014) Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **6**, 022616. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022616>
- Wang T, Larcher L, Ma L, Veedu R (2018) Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules*, **23**, 2564. <https://doi.org/10.3390/molecules23102564>

- Waye M, Wing S (2010) Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals*. **3**. 3343-3354, <https://doi.org/10.3390/ph3103343>.
- Weir DL, Laing ED, Smith IL (2014) Host cell virus entry mediated by Australian bat lyssavirus G envelope glycoprotein occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway that requires actin and Rab5. *Virology* **11**, 40 . <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-40>
- Wiethoff CM, Wodrich, H, Gerace L, Nemerow GR (2005) Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *Journal of Virology*, **79**, 1992–2000. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.1992-2000.2005>
- Wilcke M, Johannes L, Galli T, Mayau V, Goud, B, Salamero J (2000) Rab11 Regulates the Compartmentalization of Early Endosomes Required for Efficient Transport from Early Endosomes to the Trans-Golgi Network. *The Journal of Cell Biology*, **151**, 1207–1220. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1207>
- Xu L, Daly T, Gao C, Flotte TR, Song S, Byrne BJ, Sands MS, Parker K (2004) CMV- $\beta$ -Actin Promoter Directs Higher Expression from an Adeno-Associated Viral Vector in the Liver than the Cytomegalovirus or Elongation Factor 1 $\alpha$  Promoter and Results in Therapeutic Levels of Human Factor X in Mice. *Human Gene Therapy* **12**, 563-573. <http://doi.org/10.1089/104303401300042500>
- Xu L, Nagai Y, Kajihara Y, Ito G, Tomita T (2021). The Regulation of Rab GTPases by Phosphorylation. *Biomolecules*. **11**:1340. <https://doi.org/10.3390/biom11091340>
- Yamamoto H, Fara AF, Dasgupta P, Kemper C (2013) CD46: the ‘multitasker’ of complement proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **45**, 2808-2820. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.09.016>
- Yuan, W, Song C (2020) The Emerging Role of Rab5 in Membrane Receptor Trafficking and Signaling Pathways. *Biochemistry Research International*, 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/4186308>
- Zeigerer A, Gilleron J, Bogorad RL, Marsico G, Nonaka H, Seifert S, Zerial M i sur. (2012) Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, **485**, 465–470. <https://doi.org/10.1038/nature11133>

Zhang Y, Bergelson JM (2005) Adenovirus Receptors. *Journal of Virology*, **79**, 12125–12131. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12125-12131.2005>

Zhang YN, Liu YY, Xiao FC, Liu CC, Liang XD, Chen J, Qiu HJ (2018) Rab5, Rab7, and Rab11 Are Required for Caveola-Dependent Endocytosis of Classical Swine Fever Virus in Porcine Alveolar Macrophages. *Journal of Virology*, **92**. <https://doi.org/10.1128/jvi.00797-18>

Zulkefli KL, Houghton FJ, Gosavi P, Gleeson PA (2019) A role for Rab11 in the homeostasis of the endosome-lysosomal pathway. *Experimental Cell Research*. **380**, 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.010>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Klara Kašnar, 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.

Klara Kašnar

Vlastoručni potpis