

# Utjecaj utišavanja klatrina na prijenos signala MAP kinaznog puta i prepoznavanje infekcije pomoću proteina MyD88 i IFI16 nakon infekcije adenovirusom tipa 26

---

Lač, Maša

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:900941>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Maša Lač

**UTJECAJ UTIŠAVANJA KLATRINA NA  
PRIJENOS SIGNALA MAP KINAZNOG  
PUTA I PREPOZNAVANJE INFEKCIJE  
POMOĆU PROTEINA MyD88 I IFI16  
NAKON INFEKCIJE 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 uz pomoć Isabele Drašković, mag. ing. biotechn..

Rad je izrađen u sklopu 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 na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, strpljenju i susretljivosti. Zahvaljujem prof.dr.sc. Kseniji Durgo na pruženoj prilici i srdačnom pristupu.*

*Zahvaljujem Isabeli Drašković na svojoj pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada, prijateljskom pristupu i izdvojenom vremenu.*

*Zahvaljujem cijeloj obitelji, posebno mami i tati, na bezuvjetnoj ljubavi, brizi, podršci i ohrabivanju. Najveće hvala Hani koja je u svim aspektima života oduvijek bila moja najveća podrška i oslonac.*

## 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

### UTJECAJ UTIŠAVANJA KLATRINA NA PRIJENOS SIGNALA MAP KINAZNOG PUTA I PREPOZNAVANJE INFEKCIJE POMOĆU PROTEINA MyD88 I IFI16 NAKON INFEKCIJE ADENOVIRUSOM TIPA 26

*Maša Lač, univ. bacc.ing. biotechn., 0058212402*

**Sažetak:** Adenovirusni vektori se koriste u genskoj terapiji, terapiji tumora i razvoju cjepiva. Zbog visoke seroprevalencije najčešće korištenih adenovirusnih vektora, sve je više istraživanja usmjereno prema drugim adenovirusima, poput adenovirusa tipa 26 (HAdV26), koji je zbog niske seroprevalencije kandidat s visokim potencijalom za primjenu kao vektorsko cjepivo. U ovom je radu ispitana uloga klatrina u prijenosu signala MAP kinaznog puta nakon infekcije HAdV26 praćenjem aktivacije kinaza ERK i p38, kao i u prepoznavanju infekcije pomoću proteina MyD88 i IFI16. Nije zabilježena aktivacija kinaze ERK nakon infekcije HAdV26, dok je aktivacija p38 uočena u staničnoj liniji s najmanjom ekspresijom klatrina. Nakon infekcije HAdV26 uočen je unutarstanični transport proteina MyD88 i IFI16, što upućuje na njihovu uključenost u prepoznavanju infekcije HAdV26.

**Ključne riječi:** adenovirus tip 26, utišavanje klatrina, MAP kinazni put, MyD88, IFI16

**Rad sadrži:** 58 stranica, 13 slika, 5 tablica, 100 literaturnih navoda

**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:** doc. dr. sc. Dragomira Majhen, IRB

**Pomoć pri izradi:** Isabela Drašković, mag. ing. biotechn., 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. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (zamjenski član)

**Datum obrane:** 14. srpnja 2023.

## 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

EFFECT OF CLATHRIN KNOCKDOWN ON MAP KINASE SIGNALING PATHWAY AND  
RECOGNITION OF INFECTION BY PROTEINS MYD88 AND IFI16 AFTER ADENOVIRUS  
TYPE 26 INFECTION

*Maša Lač, univ. bacc.ing. biotechn., 0058212402*

**Abstract:** Adenoviral vectors are used in gene therapy, cancer therapy and vaccine development. Due to high seroprevalence of the most frequently used adenovirus vectors, recent research is directed towards other adenoviruses, such as adenovirus type 26 (HAdV26), which is a candidate with great potential for vaccine vector due to its low seroprevalence. In this work, the role of clathrin in MAP kinase pathway signalling after HAdV26 infection was examined by monitoring activation of ERK and p38 kinases, as well as in the recognition of infection by MyD88 and IFI16 proteins. No activation of ERK kinase was detected after HAdV26 infection, while p38 activation was observed in the cell line with the lowest clathrin expression. After HAdV26 infection, intracellular transport of proteins MyD88 and IFI16 was observed, indicating their role in recognition of HAdV26 infection.

**Keywords:** adenovirus type 26, clathrin silencing, MAP kinase pathway, MyD88, IFI16

**Thesis contains:** 58 pages, 13 figures, 5 tables, 100 references

**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, IRB

**Technical support and assistance:** Isabela Drašković, mag. ing. biotechn., IRB

### 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. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** July 14<sup>th</sup> 2023



<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. ADENOVIRUS ČOVJEKA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. STRUKTURA ADENOVIRUSA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. INFEKCIJA ADENOVIRUSOM .....</b>	<b>4</b>
2.3.1. Vežanje adenovirusa .....	5
2.3.2. Ulazak adenovirusa u stanicu.....	7
2.3.3. Unutarstanični transport i bijeg iz endosoma.....	8
2.3.4. Unos u jezgru .....	8
<b>2.4. UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR.....</b>	<b>9</b>
<b>2.5. ADENOVIRUSNI VEKTORI .....</b>	<b>11</b>
2.5.1. HAdV26 .....	11
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>13</b>
3.1.1. Kemikalije .....	13
3.1.2. Protutijela .....	16
3.1.3. Stanične linije.....	18
3.1.4. Adenovirusi .....	18
3.1.5. Uređaji i pomagala pri radu.....	18
<b>3.2. METODE.....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Kultura stanica .....	20
3.2.2. Umnažanje i pročišćavanje replikacijski defektnog virusa centrifugiranjem u cezijevoj kloridu (CsCl) .....	21
3.2.3. Određivanje koncentracije virusa.....	22
3.2.4. Određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusom .....	23
3.2.5. Razdvajanje proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom .....	23
3.2.6. Western blot .....	25
3.2.6. Određivanje krivulje rasta kultura stanica.....	26
3.2.7. Imunofluorescencija.....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. NAMNAŽANJE I PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSA .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. KRIVULJE RASTA KULTURA STANICA A549, A549-shCLTC-58 I A549-     shCLTC-69 .....</b>	<b>33</b>

<b>4.3. ULOGA KLATRINA U PRIJENOSU SIGNALA MAP KINAZNOG PUTA NAKON INFEKCIJE HAdV26.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4. ULOGA KLATRINA U PREPOZNAVANJU INFEKCIJE HAdV26 POMOĆU PROTEINA MYD88 I IFI16.....</b>	<b>39</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

# 1. UVOD

Adenovirusni vektori najzastupljeniji su vektori u genskoj terapiji zbog poželjnih karakteristika poput visoke efikasnosti transdukcije mirujućih stanica kao i stanica u diobi, proizvodnje do visokog titra, jednostavne manipulacije genomom i visokog kapaciteta za ugradnju transgena (Custers i sur., 2021). Najbolje proučeni adenovirusni vektori su vektori temeljeni na adenovirusima skupine C, HAdV2 i HAdV5, ali je zbog njihove visoke seroprevalencije njihovo korištenje ograničeno.

Vektori temeljeni na niskoseroprevalentnom adenovirusu tipa 26 (HAdV26) predstavljaju dobar izbor za razvoj cjepiva jer potiču snažan i dugotrajan imunski odgovor (Abbink i sur., 2007). Za razliku od nekih drugih adenovirusa, osnovna biologija, mehanizam ulaska u stanicu i poticanja imunskog odgovora nakon infekcije epitelnih stanica ovim virusom još uvijek nisu dovoljno poznati pa su potrebna daljnja istraživanja adenovirusa tipa 26 koja će omogućiti uspješniju primjenu u genskoj terapiji.

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti utjecaj klatrina na prijenos signala MAP kinaznog puta nakon infekcije adenovirusom HAdV26 te ulogu klatrina u prepoznavanju infekcije HAdV26 pomoću proteina MyD88 i IFI16. Količina aktiviranih proteina ERK i p38 koji sudjeluju u prijenosu signala MAP kinaznog puta utvrđena je SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom i Westernskom analizom. Signali proteina MyD88 i IFI16 te njihova unutarstanična lokalizacija vizualizirani su konfokalnom mikroskopijom.

## 2. TEORIJSKI DIO

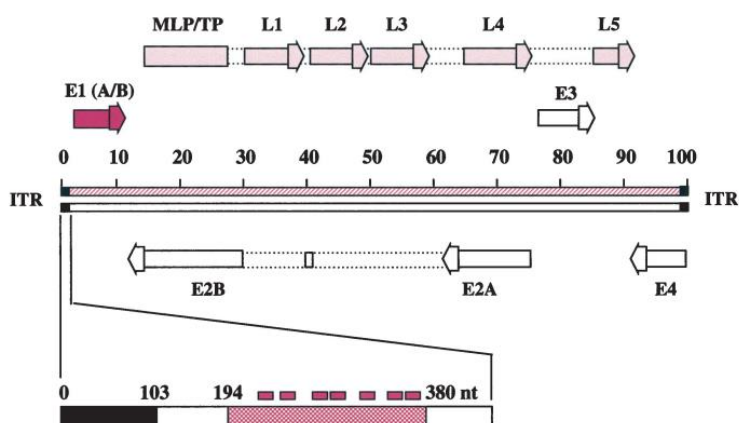
### 2.1. ADENOVIRUS ČOVJEKA

Adenovirusi su DNA virusi ikozaedarne strukture, bez ovojnice i promjera 90 nm. Pripadaju porodici *Adenoviridae* koja obuhvaća pet rodova prema domaćinu kojeg inficiraju: *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus* i *Ichtadenovirus*. Adenovirusi čovjeka (engl. *human adenovirus*, HAdV) pripadaju rodu *Mastadenovirus* i obuhvaćaju 104 tipa koji se s obzirom na sličnosti dijele na 7 podgrupa označenih od A do G. Adenovirus čovjeka prvi je put izoliran 1950-ih iz adenoidnog tkiva kao virusni agens povezan s respiratornim infekcijama (Guimet i Hearing, 2016). Ovisno o tropizmu, sklonosti virusa prema određenom tipu stanica koji može inficirati, adenovirusi čovjeka uzrokuju infekcije oka (skupine B, D i E), gornjih i donjih dišnih puteva (skupine B, C i E) te infekcije gastrointestinalnog trakta (skupine F i G) (Radke i Cook, 2018). Iako su infekcije adenovirusima u imunokompetentnim osobama većinom asimptomatske ili blagih simptoma, kod djece i imunodeficijentnih osoba mogu se razviti teži simptomi, a ponekad mogu rezultirati i smrtnim ishodom. Dosad su zabilježene epidemije HAdV skupine B (HAdV3, HAdV7, HAdV11, HAdV14), skupine C (HAdV1, HAdV2, HAdV5, HAdV6) te skupine E (HAdV4) u izoliranim skupinama odraslih ljudi te među djecom (Lynch i sur., 2011).

Adenovirusi se koriste se kao modeli u istraživanjima u području stanične biologije, replikacije DNA, ekspresije gena, translacije, imunologije i terapije tumora (Guimet i Hearing, 2016). Vektor temeljen na adenovirusima najčešće je korišten vektorski sustav u genskoj terapiji, vakcinaciji i terapiji tumora zbog dobrih karakteristika poput visokog kapaciteta kloniranja, mogućnosti inficiranja različitih tipova stanica, proizvodnje do visokog titra te svojstva da ostaje episomalno u transduciranim stanicama, odnosno, da se ne ugrađuje u genom domaćina (Wong i sur., 2013). Najbolje proučeni adenovirusi su HAdV2 i HAdV5 skupine C. Većina svjetske odrasle populacije bila je nekad tijekom života u kontaktu s navedenim adenovirusima što djelomično ograničava njihovo korištenje u genskoj terapiji i vakcinaciji. Zbog toga se pribjegava proučavanju i korištenju vektora koji se temelje na adenovirusima niske seroprevalencije, odnosno, s kojima većina populacije tijekom života nije bila u kontaktu poput HAdV26 (Fernandes i sur., 2016).

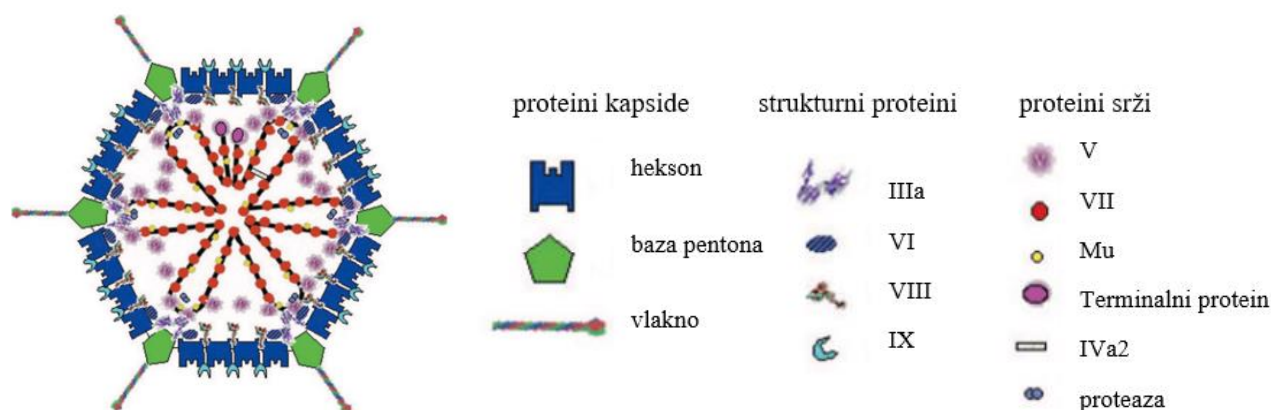
## 2.2. STRUKTURA ADENOVIRUSA

Adenovirusni genom čini linearna, dvolančana molekula DNA duljine 26 do 45 kb. Na 5' krajevima genoma nalaze se strukture nalik ukosnicama koje sadrže ishodište replikacije (engl. *inverted terminal repeats*, ITR) (Goncalves i de Vries, 2006). Geni adenovirusa mogu se podijeliti na rane (E1, E2A, E2B, E3 i E4) i kasne (L1, L2, L3, L4 i L5) (slika 1). Prije replikacije DNA ekspresija ranih gena je najjača, dok je ekspresija kasnih gena pod represijom (Fessler i Young, 1998). Ekspresijom ranih transkripcijskih jedinica nastaju proteini uključeni u replikaciju virusne DNA, regulaciju imunskog odgovora inficiranih stanica i ekspresiju kasnih gena (Gallardo i sur., 2021). Transkripcijom E1 regije nastaju proteini koji aktiviraju transkripciju ostalih ranih transkripcijskih jedinica i sprječavaju apoptozu stanice što omogućuje daljnju replikaciju virusa (Bulcha i sur., 2021). E2 geni kodiraju za proteine uključene u replikaciju DNA i aktivaciju transkripcije kasnih gena, dok su produkti E3 regije odgovorni za utišavanje imunskog odgovora stanica domaćina (Lee i sur., 2017). Produkti E4 gena su uključeni u regulaciju replikacije DNA, ekspresiju kasnih proteina, inhibiciju sinteze proteina stanice domaćina, sklapanje virusnih čestica i obranu od antivirusnih mehanizama domaćina (Kleinberger, 2019). Kasne transkripcijske jedinice sadrže gene koji kodiraju za proteine IVA2, IX te skupinu proteina glavne kasne transkripcijske jedinice (engl. *major late transcription unit*, MLTU). Sve kasne transkripcijske jedinice kodiraju za strukturne proteine i proteine uključene u pakiranje virusne čestice (Zhang i Imperiale, 2003; Farley i sur., 2004).



**Slika 1.** Shematski prikaz organizacije genoma adenovirusa. Rane transkripcijske jedinice E2A, E2B, E3 i E4 označene su bijelim strelicama, E1A/B regija označena je ružičastom strelicom. Kasne transkripcijske jedinice L1, L2, L3, L4, L5 i MLP/TP prikazane su svijetlo ružičastim strelicama. ITR sekvence označene su crnom bojom (prema Zhang, 1999)

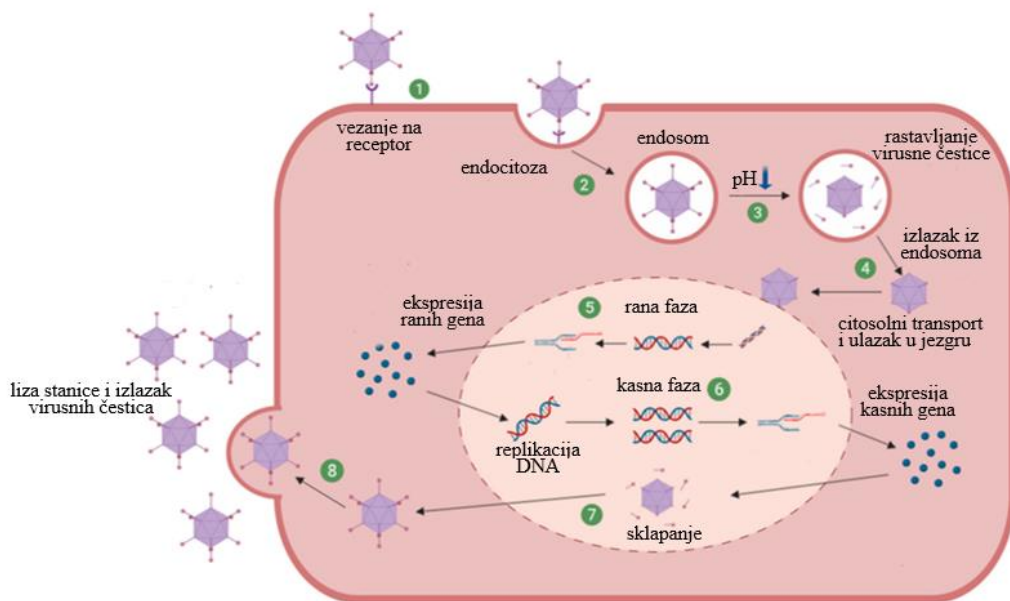
Adenovirusna čestica sastoji se od srži i proteinske kapside. Srž virusa čini genom na koji su vezani strukturni proteini koji ga povezuju s kapsidom koja je pretežito građena od heksona, baze pentona i vlakna (slika 2) (Smith i sur., 2010). 240 kopija homotrimerera heksona raspoređeno je simetrično po plohama kapside virusa, pri čemu jedna ploha sadrži 12 homotrimerera heksona (Rux i sur., 2003). Pentoni su kompleksi proteina baze pentona i vlakna. Baza pentona sadrži tripeptidnu RGD sekvencu (Arg-Gly-Asp) na koju se mogu vezati integrini, transmembranski proteini stanice. Vlakno je sastavljeno od tijela i petlje, u adenovirusnoj čestici prisutno u obliku homotrimerera (Gallardo i sur., 2021; San Martin, 2012).



**Slika 2.** Shematski prikaz strukture i organizacije adenovirusne čestice s popisom simbola i naziva proteina kapside, strukturnih proteina i proteina srži (*prema* Russel, 2009)

### 2.3. INFEKCIJA ADENOVIRUSOM

Infekcija adenovirusaom započinje vezanjem adenovirusne čestice na stanične receptore i ulaskom u stanicu endocitozom. Nakon ulaska u stanicu slijedi bijeg virusa iz endosoma i transport citosolom do jezgre domaćina gdje dolazi do unosa virusne DNA. U jezgri se virusni genom replicira, vrši se transkripcija virusnih gena, te sklapanje novih virusnih čestica koje zatim lizom izlaze iz zaražene stanice (slika 3) (Zhang, 1999).



**Slika 3.** Shematski prikaz infekcije stanice domaćina adenovirusnom česticom. (1) vezanje virusa na receptor stanice domaćina (2) endocitoza (3) djelomično rastavljanje virusne čestice (4) izlazak iz endosoma, putovanje kroz citosol i ulazak virusnog genoma u jezgro (5) ekspresija ranih gena (6) ekspresija kasnih gena (7) sklapanje virusnih čestica (8) izlazak virusnih čestica uslijed lize stanice (prema Zhang, 1999)

### 2.3.1. Vezanje adenovirusa

Vezanje adenovirusa na receptore uključuje interakcije vlakna i baze pentona virusa sa staničnim receptorima. Do danas je pokazano više različitih molekula na stanicama na koje se adenovirusi mogu vezati: CAR (engl. *Coxsackie and Adenovirus receptor*), CD46, oligosaharidi koji sadrže sijalinska kiselina, GD1a glikan, dezmglein-2 (DSG-2) i drugi (Zhang i Bergelson, 2005).

CAR je transmembranski protein koji pripada imunoglobulinskoj obitelji proteina. Ekspimiran je na površini raznih tipova stanica i u čvrstim spojevima (engl. *tight junctions*) koji su nužni u procesima migracije stanica, staničnoj adheziji i imunosnom odgovoru (Loustalot i sur., 2015; Lane i Beverly, 2005). Adenovirusi svih skupina, osim skupine B, vežu se pomoću petlje vlakna na CAR različitim afinitetom (Arnberg, 2012). Vlakno adenovirusa jednoliko je raspoređeno po kapsidi što pospješuje interakciju sa staničnim receptorima, a brojnost i dostupnost CAR-a na površini stanica utječe na uspješnost transdukcije adenovirusom (Sharma i sur., 2012). Pokazano

je da HAdV2 i HAdV5 skupine C koriste CAR kao primarni receptor za ulazak u stanicu (Meier i Greber, 2003).

CD46 je membranski protein regulator aktivacije komplementa prisutan na svim stanicama s jezgrom. Mnogi patogeni, uključujući adenoviruse skupine B te skupine D, koriste CD46 kao receptor (Liszewski i Atkinson, 2021). HAdV16, HAdV21, HAdV35 i HAdV50 skupine B koriste CD46 kao jedinstveni receptor, dok se za HAdV3, HAdV7, HAdV11 i HAdV14 pokazalo da mogu koristiti i CD46 i dezmglein-2 kao receptor (Luisoni i Greber, 2016; Segerman i sur., 2003; Sirena i sur., 2004). Dezmglein-2 je transmembranski glikoprotein prisutan na površini epitelnih stanica i uključen je u održavanje stanične adhezije (Wang i sur., 2010; Stasiak i Stehle, 2019).

Sijalinska kiselina je monosaharidni derivat neuraminske kiseline, a nalazi se na površini stanica vezana na glikoproteine i glikolipide. Uključena je u procese stanične adhezije, u razvoju stanice i imunosti sustav te služi kao receptor mnogim virusima i bakterijskim toksinima (Stencel-Baerenwald i sur., 2014). Pokazano je da HAdV26 koristi sijalinsku kiselinu kao receptor za ulazak u stanice adenokarcinoma jajnika (stanična linija SK-OV-3) te stanične linije BT-20 i MDA-231 (Baker i sur, 2019). HAdV37 skupine D koristi sijalinsku kiselinu kao receptor za ulazak u stanice (Arnberg i sur, 2000). HAdV52 skupine G, osim CAR koristi i sijalinsku kiselinu kao receptor (Lenman i sur., 2015).

Nakon vezanja adenovirusa za površinu stanice, vlakno disocira s kapside čime otkriva bazu pentona i omogućuje vezanje integrina koji okidaju signalizaciju za ulazak virusa u stanicu (Stasiak i Stehle, 2019).

Integrini su heterodimerni transmembranski proteini koji sudjeluju u procesima vezanja stanica na komponente izvanstaničnog matriksa, migraciji stanica, proliferaciji, diferencijaciji i imunom odgovoru. Sastavljeni su od dvije podjedinice,  $\alpha$  i  $\beta$ , od kojih svaka sadrži transmembransku domenu i kratki citoplazmatski dio. Postoji 18 različitih  $\alpha$  i 8 različitih  $\beta$  podjedinica koje mogu tvoriti 24 različite integrinske strukture u kralježnjacima (Stasiak i Stehle, 2019). Svi adenovirusi, osim HAdV40 i HAdV41, sadrže RGD sekvencu koja ulazi u interakcije s integrinima, uzrokuje njihovo nakupljanje (engl. *clustering*) i okida aktivaciju prijenosa signala za ulazak virusa endocitozom. Pokazano je da integrini  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  i  $\alpha 5\beta 1$  sudjeluju u ulasku adenovirusa u stanicu domaćina. Uloga integrina u ulasku virusa u stanicu proučena je kod HAdV2 i HAdV5 kojima je primarni receptor CAR, no pokazano je da je interakcija integrin-RGD važna i kod adenovirusa koji koriste druge molekule kao primarne receptore (Zhang i Bergelson, 2005). Također, Nestić i sur. (2018) pokazali su da je za uspješnu



infekciju epitelnih stanica virusom HAdV26 nužan integrin  $\alpha\beta 3$ .

### 2.3.2. Ulazak adenovirusa u stanicu

Nakon vezanja adenovirusa na stanične receptore okidaju se signalni putevi odgovorni za ulazak virusa u stanicu endocitozom. Adenovirusi nemaju ovojnica pa u stanicu mogu ući endocitozom posredovanom klatrinom, kaveolinom, fagocitozom i makropinocitozom (Dimitrov, 2004). Endocitoza posredovana klatrinom smatra se glavnim načinom ulaska adenovirusnih čestica u stanicu domaćina. Ovaj proces uključuje formiranje klatrinskog omotača oko virusa, invaginaciju klatrinom obloženih mjehurića te odvajanja istih u citosol stanice.

Formiranje klatrinskog omotača započinje nakon vezanja adenovirusa za stanične receptore kada adapterski proteini prepoznaju motive na citoplazmatskom dijelu receptora i vežu se za njih. Osim na receptore, adapterski proteini se istovremeno vežu na regije membrane bogate fosfatidilinozitol-(4,5)-bifosfatom (PI(4,5)P2) i fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfatom (PI(3,4,5)P3) i vežu klatrin. Glavni adapterski protein uključen u endocitozu je AP-2 (engl. adapter protein-2) (Meier i Greber, 2003). Povezivanjem klatrina s adapterskim proteinima i pomoćnim proteinima dolazi do njegove polimerizacije, uvijanja membrane te stvaranja stabilne klatrinske mreže koja formira mjehurić obložen klatrinom (Schmid i McMahon, 2007). Formirani mjehurić obložen klatrinom u kojem je sadržana adenovirusna čestica zatim se odvaja od membrane i otpušta u citoplazmu stanice pomoću proteina dinamina. Dinamin je GTP-aza koja se veže na suženje jamice obložene klatrinom te katalizira fisiju membrane i otpuštanje mjehurića obloženog klatrinom (Kadlecova i sur., 2017). Formirani mjehurić zatim otpušta klatrinsku mrežu i dalje se transportira citosolom stanice domaćina (Flatt i Butcher, 2019). Klatrinom posredovana endocitoza uočena je kod HAdV2, HAdV5, HAdV37 i HAdV3 (Meier i sur., 2002; Greber i sur., 1996; Gastaldelli i sur., 2008; Lee i sur., 2020; Amstutz i sur., 2008). Endocitoza posredovana kaveolinom odvija se na domenama membrane bogatim kolesterolom i sfingolipidima. U takvim regijama dolazi do formiranja kaveola, odnosno invaginacije membrane koju gradi protein kaveolin (Razani i sur., 2002). Endocitoza posredovana kaveolinom povezana je s internalizacijom membranskih komponenti, vanstaničnih liganada, bakterijskih toksina te nekoliko vrsta virusa bez ovojnice (Pelkmans i Helenius, 2002). Pokazano je da HAdV37 ulazi u stanicu kaveolinom posredovanom endocitozom, ali i posebnom vrstom klatrinom posredovane endocitoze neovisne o dinaminu (Lee i sur., 2020).

Makropinocitoza je nespecifična vrsta endocitoze bez receptora i formiranja omotača. Ovisno o

transportu formiranog makropinosoma i vrsti receptora, makropinocitoza može biti procesivna i reciklirajuća (Meier i Greber, 2004). Neki od adenovirusa koji koriste makropinocitozu kao primaran način ulaska u stanicu su HAdV3 i HAdV35 (Kälin i sur., 2010; Amstutz i sur., 2008).

### 2.3.3. Unutarstanični transport i bijeg iz endosoma

Virus se nakon endocitoze nalazi u endosomu iz kojeg mora izaći kako bi izbjegao razgradnju te unutarstaničnim transportnim mehanizmima dospjeti do jezgre stanice. Mehanizam unutarstaničnog transporta je najbolje istražen kod HAdV2 i HAdV5 (Greber i sur., 1993; Leopold i sur., 1998) pri čemu je poznato da disociranje klatrinskog omotača omogućava izlaganje kapsidnog proteina VI koji posjeduje litičku aktivnost kojom razgrađuje membranu endosoma. Izlaganje kapsidnog proteina VI na površinu virusne čestice potaknuto je interakcijom adenovirusa i receptora na površini stanice, odnosno, pomicanjem unutar kapside (Flatt i Butcher, 2019). Litička aktivnost ovog proteina i njegova uloga u regulaciji stabilnosti kapside i bijega adenovirusa iz endosoma istražena je na termosenzitivnom mutantu Ad2-ts i mutantu Ad2 s točkastom mutacijom u genu za protein VI (Flatt i Butcher, 2019). Adenovirusna čestica nakon bijega iz endosoma koristi motorne proteine dinein i kinezin za putovanje po mikrotubulima do jezgre gdje se veže na kompleks jezgrine pore i unosi svoj genom (engl. *nuclear pore complex*, NPC) (Strunze i sur., 2011).

### 2.3.4. Unos u jezgru

Djelomično rastavljena adenovirusna čestica transportira se citosolom vezana na dinein prema središtu organizacije mikrotubula (engl. *microtubule-organizing center*, MTOC), koji se nalazi u perinuklearnom području stanice. Izlazak virusne DNA iz kapside i transport genoma u jezgru odvija se na kompleksu jezgrine pore (engl. *nuclear pore complex*, NPC) te zahtjeva interakcije s kinezinom Kif5C. NPC je multiproteinski kompleks sastavljen od nukleoporina, od kojih nukleoporini Nup214 i Nup358 imaju funkciju vezanja adenovirusa i kinezina-1 (Cronshaw i sur., 2002; Strunze i sur., 2011). Teški lanac kinezina Kif5C tvori interakcije s nukleoporinom Nup358, dok laki lanac tvori interakcije s kapsidnim proteinom IX. Uslijed istovremene interakcije kinezina s nukleoporinom i proteinom IX stvara se mehanička sila koja uzrokuje pucanje kapside i oslobađanje genoma adenovirusa povezanog s nekoliko stotina molekula proteina VII (Strunze i sur., 2011). Protein VII vezan na adenovirusni genom štiti DNA od mehanizma popravka dvolančanog loma (Karen i Hearing, 2011). Fragmenti virusne kapside

ostaju u perinuklearnom području stanice i transportiraju se u citosol, dok se adenovirusni genom transportira u jezgru pomoću proteina transportina, importina  $\beta$  i importina 7 (Wolfrum i Greber, 2013).

## 2.4. UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR

Urođeni imunosni odgovor predstavlja prvu liniju obrane od patogena putem prepoznavanja specifičnih molekularnih uzoraka konzerviranih među patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) preko Toll-like receptora (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i ostalih receptora za prepoznavanje uzoraka (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR). Prisustvo PAMP motiva aktivira signalne puteve urođenog imunosnog odgovora koji uključuje aktivaciju i otpuštanje citokina i kemokina kako bi se okolna tkiva upozorila na prisutnost patogena. Citokini i kemokini su signalne molekule koje aktiviraju unutarstanične i vanstanične upalne odgovore i mehanizme obrane koji uključuju privlačenje stanica imunosnog sustava, uklanjanje inficiranih stanica i poticanje upalnog stanja organizma (Atasheva i Shayakhmetov, 2022).

Imunosni sustav može prepoznati komponente adenovirusa u različitim fazama replikacijskog ciklusa. Pokretanje urođenog imunosnog odgovora događa se prepoznavanjem HAdV uslijed interakcije s receptorima. Receptori su lokalizirani na staničnoj membrani, membrani endosoma, u citoplazmi te izvanstanično. Osim Toll-like receptora (engl. *Toll-like receptors*, TLR) postoje i drugi PRR: receptori slični NOD-u (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*, NLR), receptori slični RIG-u (engl. *the retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors*, RLR) te lektinski receptori tipa C (engl. *C-type lectin receptors*, CLR) (Amarante-Mendes i sur., 2018). TLR je najbolje istražena skupina PRR. Transmembranski su proteini građeni od transmembranske domene bogate leucinom (engl. *leucine-rich repeat*, LRR) odgovorne za prepoznavanje patogena i citoplazmatske TIR domene (engl. *Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor*) odgovorne za aktivaciju signalnih puteva imunosnog odgovora stanice (Takeuchi i Akira, 2009). Razlikujemo 10 humanih receptora označenih od 1 do 10, lokaliziranih u različitim dijelovima stanice (Kawai i Akira, 2010); TLR2 i TLR4 lokalizirani su na staničnoj membrani dok su TLR7, TLR8 i TLR9 lokalizirani na endosomalnoj membrani (Fejer i sur., 2011). Nakon prepoznavanja virusa, TLR aktivira signalne puteve koji omogućuju odgovarajući imunosni odgovor stanice pomoću adaptorskih proteina MyD88 (engl. *Myeloid differentiation factor 88*) i/ili TRIF (engl. *TIR-domain containing adaptor molecule*). Oni zatim okidaju signalnu kaskadu koja aktivira transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B koji aktivira transkripciju upalnih citokina i kemokina (Kawai i Akira, 2007). Interakcija MyD88 s TLR također okida prijenos

signala koji rezultira aktivacijom interferon regulatornih faktora IRF3 (engl. *interferon regulatory factor 3*) i IRF7 (engl. *interferon regulatory factor 7*). Aktivirani IRF3 i IRF7 potiču ekspresiju interferona tipa 1 (engl. *interferon type 1*, IFN1) te citokina IFN $\alpha$  i IFN $\beta$  (Takeuchi i Akira, 2009; McNab i sur., 2015).

Interakcija RGD motiva baze pentona adenovirusa s integrinima ključan je korak koji omogućuje ulazak adenovirusa u stanicu, ali i aktivira signalni put odgovoran za ekspresiju upalnih citokina i kemokina od kojih je najznačajniji IL-1 $\alpha$ , citokin koji doprinosi antivirusnom imunom odgovoru (Fitzgerald, 2009).

Detekcija virusne DNA u citosolu potiče aktivaciju ekspresije interferona skupine 1 putem citoplazmatskih DNA senzora. Do danas su identificirana tri DNA senzora: interferon- $\gamma$ -inducibilni protein 16 (engl. *IFN- $\gamma$ -inducible protein 16*, IFI16), DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) polipeptid 41 (engl. *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41*, DDX41) i ciklički gvanozin monofosfat-adenozin monofosfat sintaza (engl. *cyclic guanosine monophosphate- adenosine monophosphate synthase, cGMP-AMP synthase, cGAS*) (Hendrickx i sur., 2014). Interakcijom citosolnih DNA senzora s virusnim genomom aktivira se protein STING na endoplazmatskom retikulumu (Tanaka i Chen, 2012). STING zatim preko proteina IRF3 i TBK1 (protein kinaza 1) potiče aktivaciju ekspresije interferona  $\beta$  (Hendrickx i sur., 2014).

Interakcija virusa s raznim staničnim receptorima okida brojne signalne puteve, uključujući i MAPK signalni put. MAP (engl. *mitogen-activated protein kinases*) su proteinske kinaze specifične za aminokiseline serin i treonin uključene u regulaciju procesa poput ekspresije gena, mitoze, metabolizma stanice, pokretljivosti, preživljavanja, apoptoze i diferencijacije stanice kao odgovor na izvanstanični podražaj (Cargnello i Roux, 2011). Najbolje istražene MAPK sisavaca su ERK1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*), JNK (engl. *c-jun N-terminal kinase*) i p38. Aktivacija svih MAP kinaza vrši se fosforilacijom MAPK kinazama (MAPKK). ERK i p38 signalne kaskade aktiviraju se uslijed infekcije stanice virusom, lučenja citokina i aktivacijom TLR, a rezultiraju aktivacijom transkripcijskih faktora uključenih u sintezu raznih citokina (Smith i sur., 2011).

## 2.5. ADENOVIRUSNI VEKTORI

Adenovirusni vektori dijele se na replikacijski defektne i replikacijski kompetentne vektore (Wold i Toth, 2013). Razvoj replikacijski defektnih adenovirusnih vektora temelji se na modifikaciji genoma adenovirusa uklanjanjem određenih viralnih gena te umetanjem ekspresijskih kazeta koje sadrže željene gene. Obzirom na to da se tijekom konstrukcije adenovirusnih vektora uklanjaju geni adenovirusa potrebni za replikaciju virusa, namnažanje virusa vrši se u staničnim linijama koje komplementiraju deletirane gene, najčešće HEK293 stanična linija. Replikacijski kompetentni vektori koriste se u genskoj terapiji tumora s ciljem lize tumorskih stanica kao rezultata replikacijskog ciklusa adenovirusa (Wold i Toth, 2013).

Replikacijski defektni adenovirusni vektori dijele se na vektore prve, druge i treće generacije, ovisno o opsegu deletiranih gena. Prva generacija adenovirusnih vektora temelji se na deleciji E1 i E3 gena, što omogućuje ugradnju transgenskih kazeta veličine do 6.5 kb. Budući da takvi vektori aktiviraju jak imunski odgovor na adenovirusne proteine te postoji mogućnost nastanka replikacijski kompetentnih adenovirusa uslijed spontane homologne rekombinacije, razvijeni su adenovirusni vektori druge generacije. Ad vektori druge generacije konstruirani su tako da, osim delecije E1 i E3, imaju i deletiranu E2a, E2b ili E4 regiju, što omogućuje unos transgenih kazeta veličine do 10.5 kb. Takvi su vektori pokazali produljenu ekspresiju transgena u usporedbi s vektorima prve generacije, no i dalje s jakim imunskim odgovorom domaćina. Treća generacija adenovirusnih vektora temelji se na deleciji svih viralnih gena osim ITR sekvenci i pakirajućeg signala. Takvi se vektori nazivaju *guttles* vektori i omogućuju ugradnju do 36 kb transgena. Kako bi se mogli umnožiti u komplementirajućim stanicama potreban im je tzv. helper virus koji sadrži gene čijom ekspresijom nastaju proteini potrebni za pakiranje *guttles* vektora (Parks i sur., 1996). U usporedbi s Ad vektorima prve i druge generacije, *guttles* vektori izazivaju slabiji imunski odgovor i omogućuju produljenu ekspresiju transgena. Tijekom pročišćavanja *guttles* vektora potrebno je osigurati da je vektor u potpunosti pročišćen od helper virusa kako bi se osigurala efikasnost i sigurnost korištenja vektora *in vivo* (Bulcha i sur., 2021).

### 2.5.1. HAdV26

Adenovirusni vektori temeljeni na adenovirusima skupine C (HAdV2 i HAdV5) najproučavaniji su i najčešće korišteni adenovirusi u genskoj terapiji. Njihova visoka seroprevalencija ograničava primjenu kod ljudi jer već postojeća stečena imunost može onemogućiti učinkoviti prijenos gena. Osim ograničenja učinkovitosti potencijalnih terapeutika, imunski odgovor

protiv vektora visoke seroprevalencije može uzrokovati niz nuspojava uslijed ponavljane primjene vektora, koje uključuju sindrom sustavnog upalnog odgovora i toksično oštećenje jetre (Fernandes i sur., 2016; Vlachaki i sur., 2002; Raper i sur., 2003). Zbog navedenih razloga, sve se više istraživanja usmjerava prema adenovirusnim vektorima niže seroprevalencije. HAdV26 je adenovirus niske seroprevalencije na što upućuju značajno niže frekvencije neutralizacijskih antitijela u raznim populacijama u usporedbi s količinom neutralizacijskih antitijela prema HAdV5 (Custers i sur., 2021). U ispitivanjima imunogeničnosti niskoseroprevalenih adenovirusnih vektora iz skupina B i D, HAdV26 je pokazao najvišu imunogeničnost u životinjama (Custers i sur., 2021). Također, pokazano je da HAdV26, HAdV35 i HAdV48, koji primarno koriste CD46 kao receptor, *in vivo* u rezus majmunima potiču znatno jači urođeni imunosni odgovor posredovan citokinima od HAdV5 koji koristi CAR kao receptor (Teigler i sur., 2012). Trenutno se mnoga cjepiva temeljena na vektoru HAdV26 nalaze u kliničkim ispitivanjima, neka od kojih su cjepiva protiv HIV-a (engl. *Human Immunodeficiency Virus*), virusa Ebole, Zika virusa, Filo virusa, malarije, HPV-a (engl. *Human Papilloma Virus*) i RSV-a (engl. *Respiratory Syncytial Virus*) (Custers i sur., 2021). Cjepivo protiv Ebole *Zabdeno* odobreno je od strane agencije EMA (engl. *European Medicines Agency*) 2020. godine (Woolsey i Geisbert, 2021). Također, trenutno su dva cjepiva temeljena na vektoru HAdV26 odobrena za upotrebu protiv virusa SARS-CoV-2, cjepivo *Sputnik V* koje se temelji na kombinaciji vektora HAdV26 i HAdV5 te cjepivo *Janssen* (Majhen, 2022).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

Popis osnovnih korištenih kemikalija naveden je u Tablici 1, a popis otopina i pufera te njihova priprema u Tablici 2.

**Tablica 1.** Popis korištenih kemikalija

Naziv	Proizvođač
Alexa Fluor 488	Thermo Scientific, SAD
Alexa Fluor 546	Invitrogen , SAD
Akrilamid	Sigma-Aldrich, Njemačka
amidocrno (engl. amido black)	Kemika Hrvatska
amonijev klorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich, SAD
amonijev persulfat, APS	Serva, Njemačka
beta-merkaptetanol	Fluka, Njemačka
bromfenol plavilo (engl. bromophenol blue)	Serva, Njemačka
cezijev klorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, Njemačka
DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol)	Invitrogen, SAD
Deionizirana voda (diH <sub>2</sub> O)	-
DMSO (dimetilsulfoksid)	Sigma-Aldrich, Njemačka
DMEM, Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium)	Sigma-Aldrich, Njemačka
DPBS (engl. Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline), fosfatni pufer bez Ca <sup>2+</sup> i Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich, Njemačka
Etanol	GramMol, Hrvatska
Glicerol	Kemika, Hrvatska
goveđi serumski albumin (engl. Bovine Serum Albumine, BSA)	Macherey-Nagel, Njemačka

**Tablica 1.** Popis korištenih kemikalija - nastavak

Naziv	Proizvođač
Mlijeko u prahu, nemasno	Carl Roth, Njemačka
Pierce ECL Westernska analizating Substrate, kemiluminiscentni reagens za Westernska analiza analizu	Thermo Fisher Scientific, SAD
PageRuler Prestained Protein Ladder, proteinski marker za SDS elektroforez	Thermo Scientific, SAD
Paraformaldehyd, PFA 4 %	Sigma, Njemačka
reH <sub>2</sub> O	-
SDS (natrij-dodecil sulfat)	Sigma-Aldrich, Njemačka
Serum fetusa goveda (engl. Fetal Bovine Serum; FBS)	Sigma-Aldrich, SAD
TEMED (N,N,N,N-tetrametiletildiamin)	Sigma-Aldrich, SAD
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Njemačka
Tris baza	Sigma-Aldrich, SAD
Tris-HCl	Merck Millipore, Njemačka
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, Njemačka
Virocid 1%	Genera, Hrvatska

**Tablica 2.** Popis korištenih otopina i pufera i njihova priprema

Naziv	Priprema
Amidocrno boja 0,1 %	45 mL metanola, 10 mL octene kiseline, 45 mL vode, 0,1 g amido black otopine
10 X TBS	500 mL Tris-HCl (pH 7,5), 300 mL 5 M NaCl, 200 mL diH <sub>2</sub> O, čuva se pri 4 °C



**Tablica 2.** Popis korištenih otopina i pufera i njihova priprema - nastavak

Naziv	Priprema
6 X SB pufer (engl. sample buffer; za SDS-PAGE)	6 X SB pufer (engl. sample buffer; za SDS-PAGE) 1.2 g SDS otopi se u 2 mL diH <sub>2</sub> O, doda se 2.5 mL 1.5M Tris-HCl (pH 6.8) i 30 mg bromfenol plavila, nakon što se otopi doda se 3 mL glicerola i 1.2 mL β-merkaptioetanol. Dopuni se do 10 mL diH <sub>2</sub> O i čuva pri -20 °C
akrilamid/bisakrilamid miks 30 %	29,2 g akrilamida i 0.8 g bisakrilamida otopi se u 100mL diH <sub>2</sub> O
APS, 10 %	500 mg APS-a otapa se u 5 mL diH <sub>2</sub> O, čuva se pri -20°C
DMEM-FBS (0.2 %)	10 mL FBS u 5000 mL DMEM
DMEM-FBS (10 %)	500 mL FBS u 5000 mL DMEM
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
otopina za odbojavanje	40 mL metanola, 7 mL octene kiseline, 53 mL vode
pufer PS	10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS u diH <sub>2</sub> O
pufer TBST	50 mL pufera 10x TBS, 450 mL diH <sub>2</sub> O, 450 μL Tween-20
pufer TD	TD 8 g NaCl i 0.38 g KCl otopi se u 150 mL diH <sub>2</sub> O, doda se 0.1g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH <sub>2</sub> O, podesi pH 7.4-7.5, nadopuni do 1 L s diH <sub>2</sub> O; sterilizira se autoklaviranjem

**Tablica 2.** Popis korištenih otopina i pufera i njihova priprema - nastavak

Naziv	Priprema
pufer Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	6 g Tris-HCl otopi se u 80 mL diH <sub>2</sub> O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, nadopuni se diH <sub>2</sub> O do 100mL, čuva se pri 4°C
pufer Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M)	18.2 g Tris-HCl otopi se u 100 mL diH <sub>2</sub> O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, čuva se pri 4°C
pufer za uklanjanje vezanih protutijela za membranu (engl. stripping buffer)	100 mM otopina glicina u diH <sub>2</sub> O, pH 2,8
transfer pufer	50 ml Tris-glicinski pufer pH 8,3, 350 ml diH <sub>2</sub> O, 100ml etanol

## 3.1.2. Protutijela

**Tablica 3.** Popis korištenih protutijela

Specifičnost protutijela	Proizvedeno u organizmu	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Primarna protutijela				
pERK	Miš	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7383
ERK	Zec	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-94
pp38	Miš	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-166182

**Tablica 3.** Popis korištenih protutijela – nastavak

Specifičnost protutijela	Proizvedeno u organizmu	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Primarna protutijela				
p38	Zec	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-535
MyD88	Miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-74532 lot #F0716
IFI-16	Miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-8032 lot # B1516
Sekundarna protutijela				
anti-miš imunoglobulini, obilježeni peroskidazom hrena	ovca	1:10000	GE Healthcare, SAD	G21040 lot #1925065
anti-zec imunoglobulini, obilježeni peroskidazom hrena	koza	1:5000	Thermo Fischer Scientific, SAD	W1335563 lot 31466
anti-zec IgG obilježeni s Alexa Fluor 546	koza	1:1000	Invitrogen Molecular Probes, SAD	A31572 lot 52636A

### 3.1.3. Stanične linije

U ovom radu korištene su adherentne stanice adenokarcinoma pluća čovjeka (engl. *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*, A549, ATCC® CCL-185), pripadajući klonovi sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina A549-shCLTC-58 (ekspresija klatrina smanjena 26%) i A549-shCLTC-69 (ekspresija klatrina smanjena 65%) transficirani plazmidom pI(shCLTC) koji kodira za shRNA klatrina, prethodno konstruirani u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, te klon HEK-293-K1 (engl. *human embryonal kidney*, HEK-293, ATCC® CRL-1573TM) sa stabilno povećanom ekspresijom  $\alpha\beta 3$  integrina.

### 3.1.4. Adenovirusi

U ovom radu korišten je replikacijski defektan adenovirus HAdV26 koji eksprimira transgen GFP (engl. green fluorescent protein) pod regulacijom CMV promotora. Replikacijski defektan HAdV26 umnožio se u komplemetirajućim stanicama HEK-293-K1 te pročistio ultracentrifugiranjem u gradijentu cezijeva klorida.

### 3.1.5. Uređaji i pomagala pri radu

**Tablica 4.** Popis korištenih uređaja i pomagala

Naziv	Proizvođač
ampule za smrzavanje stanica	Nunc, Danska
analitička vaga AB54-S	Mettler Toledo Classic
aparatura za izlivanje gela i za vertikalnu elektroforezu proteina Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems	BioRad, SAD
brojač stanica Coulter Counter	Beckman Coulter, SAD
centrifuga za mikroeprevute (do 14000 × g)	Eppendorf, Njemačka
Centrifuga MSE Harrier 18/80	Camlab, UK
epruvete za centrifugiranje Ultra-Clear 344059	Beckman, SAD
Evos Cell Imaging Mikroskop	Thermo Scientific, SAD

**Tablica 4.** Popis korištenih uređaja i pomagala – *nastavak*

Naziv	Proizvođač
Erlenmeyer staklene tikvice različitih zapremnina	VWR, SAD
Falkon epruvete različitih zapremnina	Falcon Becton Dickinson, SAD
Gumena strugalica	Falton Becton Dickinson, SAD
Hamilton igla	Hamilton, Švicarska
Igla za pročišćavanje virusa	Merck, Švicarska
inkubator za uzgoj stanica HeraCell 150	Heraeus, Njemačka
izvor napajanja za elektroforezu proteina i transfer PowerPac Basic	BioRad, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
kadica za elektroforezu i transfer proteina	BioRad, SAD
kadica za gel elektroforezu	BioRad, SAD
kolona Sephadex G25M GE	Healthcare Life Sciences, Velika Britanija
Konfokalni mikroskop (Leica SP8 X FLIM)	Leica, Njemačka
mikroepruvete	Eppendorf, Njemačka
Mikropipete	Eppendorf, Njemačka
Nanodrop	Thermo Scientific, SAD
nastavci za mikropipete s filtrom i bez filtra	Eppendorf, Njemačka
nitrocelulozna membrana s porama 0,45 $\mu\text{m}$	Amersham Pharmacia Biotech, Švedska
Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm	Falcon, SAD
pipete, plastične, različitih zapremnina	Sigma-Aldrich, SAD
pipete, staklene, različitih zapremnina	Bellco, SAD i Hirschmann, Njemačka
Pločice za uzgoj s 6 i 24 bunarića	Falton Becton Dickinson, SAD
Protočni citometar	FACSCalibur, Becton Dickinson, SAD
sustav za vertikalnu elektroforezu	Bio-Rad, Njemačka
Stakalca za konfokalni mikroskop	Vitrognost, Hrvatska
svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka

**Tablica 4.** Popis korištenih uređaja i pomagala - *nastavak*

Naziv	Proizvođač
ultracentrifuga Optima XL-100K	Beckman, SAD
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom Ultrasonic Processor	Cole Palmer, SAD
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala ChemiDoc Imaging System	BioRad, SAD
vodena kupelj	Tehtnica, Slovenija
vertložna mješalica EV 102	Tehtnica, Slovenija
zibalica Vibromix 314 EVT /tresilica	Tehtnica, Slovenija

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Kultura stanica

##### 3.2.1.1. Uzgoj stanica

Sve stanične linije uzgajaju se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture koji održava konstantnu temperaturu 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub> u smjesi zraka. Stanice se uzgajaju u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm, u mediju za uzgoj stanica DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) s dodatkom 10 % seruma fetusa goveda (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS). Sve stanične linije su adherentnog tipa, rastu pričvršćene za dno Petrijeve zdjelice sve dok ne ispune dostupnu površinu, iscrpe hranjive sastojke ili prestanu rasti zbog nakupljenih toksičnih metabolita.

##### 3.2.1.2. Održavanje stanica

Presadivanje stanica vrši se kad konfluentnost stanica dosegne 60-80 %. Konfluentnost stanica prati se invertnim svjetlosnim mikroskopom. Tijekom presađivanja stanica iz Petrijeve zdjelice promjera 10 cm prvo je potrebno ukloniti medij, zatim stanice isprati s 1 ml PBS pufera te dodati 1 ml tripsina, oboje prethodno zagrijanih na 37 °C, kako bi se stanice odvojile od stijenki Petrijevih zdjelica. Stanice se inkubiraju dok se invertnim svjetlosnim mikroskopom ne uoči zaokruživanje stanica i odvajanje od podloge za rast, potom se dodaje 9 ml medija DMEM s dodatkom 10 % FBS zagrijanog na 37 °C kako bi se inhibiralo djelovanje tripsina. Stanice se resuspendiraju u mediju, određuje im se koncentracija brojanjem u Bürker-Türkovoj komorici i nasaduju u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm u željenoj koncentraciji i dodaje se medij do

ukupnog volumena od 10 ml. Petrijevke se čuvaju u inkubatoru za uzgoj stanične kulture.

### *3.2.1.3. Zamrzavanje i odmrzavanje stanica*

Stanice se zamrzavaju u parama tekućeg dušika pri  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se održala zaliha stanica. Postupak zamrzavanja započinje centrifugiranjem odignutih i resuspendiranih stanica 10 min pri  $1100 \times g$ , zatim se uklanja supernatant, a stanični talog se resuspendira u 1 ml medija s dodanim 5 % DMSO. Tako pripremljena suspenzija stanica prebacuje se u ampulu za smrzavanje, kratko se inkubira u ledenom bloku (30 min), zatim se premješta u prsten tekućeg dušika kako bi se uzorci zamrznuli u parama tekućeg dušika te sljedeći dan pohranjuje u spremnik s tekućim dušikom. Stanice se odmrzavaju inkubiranjem ampule u vodenoj kupelji pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  te resuspendiranjem u prethodno zagrijanom mediju za uzgoj stanica DMEM s dodatkom 10 % FBS. Stanice se nasaduju u novu Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm i uzgajaju u inkubatoru za uzgoj stanične kulture. Nakon 24 sata uzgoja potrebno je promijeniti medij kako bi se uklonio DMSO dodan pri zamrzavanju zbog toksičnog djelovanja na stanice.

### *3.2.2. Umnažanje i pročišćavanje replikacijski defektnog virusa centrifugiranjem u cezijeve kloridu (CsCl)*

Za umnažanje replikacijski defektnih adenovirusa HAdV26 koriste se komplementirajuće HEK-293-K1 stanice koje u genomu imaju stabilno ugrađenu E1 regiju adenovirusnog genoma. HEK-293-K1 stanice uzgajaju se u 60 Petrijevih zdjelica promjera 10 cm te inficiraju dodatkom prethodno pripremljenog supernatanta infekcije HAdV26. Inficirane stanice se inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanične kulture dok se ne uoči citopatogeni učinak koji slijedi 48-72 sata nakon infekcije. Infekcija se vizualno prati pomoću EVOS Cell Imaging sustava. Kada se uoči citopatogeni učinak, stanice se odvajaju od podloge pipetiranjem i zajedno skupljaju u Falcon epruvetu pipetom koja sadrži filter te centrifugiraju 10 min pri  $1100 \times g$ . Ukupni talog stanica se resuspendira u 10 ml medija DMEM-FBS (10 %) i provodi kroz tri ciklusa smrzavanja ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i odmrzavanja ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kako bi se virusi oslobodili iz stanica. Suspenzija se potom centrifugira 10 min pri  $3600 \times g$  kako bi se virusne čestice sadržane u supernatantu odvojile od istaloženih fragmenata stanica. Virusne čestice iz supernatanta se pročišćavaju na jastučiću CsCl, a potom u gradijentu CsCl.

Pročišćavanje na jastučiću CsCl provodi se na način da se u epruvetu dodaje 2,4 ml CsCl gustoće 1,4 g/ml, obilježi se razina dodanog CsCl, a zatim se nadslojava s 2,5 ml CsCl gustoće 1,25 g/ml

dokapavanjem, kako ne bi došlo do miješanja slojeva. Na nadslojene otopine CsCl dodaje se 7 ml supernatanta s oslobođenim virusnim česticama i do vrha epruvete nadopuni medijem DMEM-FBS (10 %). Epruvete se potom centrifugiraju u ultracentrifugi pri 20 °C i 60 000 x g tijekom 1 h i 45 min. Nakon centrifugiranja virusne čestice se nalaze na granici između dva sloja CsCl vidljive u obliku bijele vrpce. Iznad prve vrpce nalazi se druga bijela vrpca u kojoj su sadržane prazne virusne kapside i nečistoće. Prvi sloj virusa pažljivo se skuplja pomoću šprice sa iglom u volumenu do 1,5 ml.

Drugi korak pročišćavanja odvija se ultracentrifugiranjem u gradijentu cezijeva klorida. Uzeti volumen suspenzije virusnih čestica pomiješa se u novoj epruveti za ultracentrifugiranje s CsCl gustoće 1,34 g/ml do vrha epruvete. Tako pripremljen uzorak se zatim centrifugira preko noći, pri 20 °C i 60 000 x g. Virusne čestice tijekom centrifugiranja prolaze kroz zone stvorenog gradijenta gustoće CsCl i zaustavljaju u dijelu u kojem je gustoća CsCl jednaka gustoći virusnih čestica. Ultracentrifugiranjem se dobiva oštar bijeli sloj pročišćenih virusnih čestica koji se skuplja pomoću šprice s iglom u što manjem volumenu. CsCl se iz uzorka pročišćenih virusnih čestica uklanja gel filtracijom pomoću kolone Sephadex-G25M (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Kolona se pričvrsti na metalni stalak, odreže se njen vrh i potom se odčepi s gornje strane kako bi tekućina sama iscurila. Kolona se prije dodavanja pročišćenog virusa ispiri 6 puta s po 50 ml PBS pufera. Nakon ispiranja, na kolonu se dodaje do 1 ml pročišćenog virusa i u mikroeprevetu se skuplja prvi eluat označen kao frakcija 0. Zatim se u intervalima u kolonu dodaje po 0,5 ml pufera PBS uz istovremeno sakupljanje frakcija u mikroeprevete. Frakcije u kojima se naalazi virus se skupe te se doda glicerol do 10 % konačnog volumena. Suspenzija virusnih čestica se alikvotira i smrzava pri -80 °C.

### 3.2.3. Određivanje koncentracije virusa

Koncentracija pročišćenih virusa određuje se spektrofotometrijskom metodom (Mitterender i sur., 1996). Postupak započinje pripremom razrjeđenja virusa u PBS puferu i 0.1 % SDS te inkubiranjem 10 min pri 56 °C. Tijekom inkubacije dolazi do oslobađanja virusne DNA iz kapsida. Mikroeprevete se nakon inkubacije kratko centrifugiraju pri 10 000 x g, zatim se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 260 nm. Koncentracija virusnih čestica računa se prema formuli :

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

gdje N označava broj virusnih čestica u 1 mL,  $A_{260}$  izmjerenu apsorbanciju pri 260 nm, a r



razrjeđenje virusa.

#### 3.2.4. Određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusom

Uspješnost transdukcije adenovirusom određuje se protočnom citometrijom. Protočna citometrija je metoda multiparametarske analize pojedinačnih stanica u tekućini. Temelji se na korištenju snopa laserskog svjetla kao izvora svjetlosti, koji obasjava pojedinačne stanice i uzrokuje lom svjetlosti ili fluorescencije koje se analiziraju detektorima (McKinnon, 2018). HAdV26 ima ugrađen gen koji kodira zeleni fluorescentni protein, pa se na temelju njegove ekspresije može odrediti postotak transduciranih stanica protočnom citometrijom.

Uspješnost transdukcije adenovirusom HAdV26 određena je u A549 stanicama. U pločicu s 12 bunarića nasadi se  $5 \times 10^4$  stanica po bunariću. Nakon 24 sata stanice se pobroje kako bi se odredio volumen virusnog razrjeđenja potreban za infekciju. Volumen adenovirusa određuje se na temelju MOI vrijednosti ( $1 \times 10^4$  vp/st) te koncentracije adenovirusa. Dodaje se medij do konačnog volumena od 500  $\mu$ L po uzorku te se sa pripremljenim virusnim razrjeđenjem inficiraju stanice. Stanice se potom inkubiraju 2 sata, nakon čega se virusno razrjeđenje makne i dodaje 1 ml svježeg medija. Uspješnost transdukcije određuje se protočnim citometrom nakon 48 sati inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica. Stanice se 48 sati nakon infekcije pripremaju za analizu protočnom citometrijom. Stanice se prvo ispiru sa 300  $\mu$ L PBS-a pa tripsiniziraju dodatkom 300  $\mu$ L tripsina. Nakon odvajanja od podloge za rast, stanice se resuspendiraju uz dodatak 1200  $\mu$ L PBS-a. Cijeli volumen se prenosi u mikroeprijetu od 2 mL i centrifugira pri 1200 x g 5 minuta. Supernatant se baca, a stanični talog se resuspendira dodatkom 500  $\mu$ L PBS-a te ponovo centrifugira pri 1200 x g 5 minuta. Supernatant se baca, a stanice se zatim fiksiraju. Fiksiranje stanica provodi se dodatkom 1 %-tnog PFA i inkubacijom 10 minuta. Nakon 10 minuta dodaje se 500  $\mu$ L PBS-a i ponovo centrifugira pri 1200 x g 5 minuta. Supernatant se baca i dodaje se 400  $\mu$ L PBS-a. Tako pripremljen uzorak spreman je za analizu protočnom citometrijom.

#### 3.2.5. Razdvajanje proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom

SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE, engl. Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) je denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza koja se koristi za razdvajanje proteina u električnom polju. Natrijev dodecil-sulfat je denaturirajući anionski detergent koji vezanjem na proteine akumulira negativan naboj na njima te izjednačava

omjer naboja i mase proteina pa se stoga razdvajanje proteina pomoću SDS-PAGE temelji na razlici u molekulskoj masi.

Uzorci za SDS-PAGE skupljaju se metodom vrućeg pufera. Stanice se inficiraju adenovirusom ( $\text{MOI}=10^4$  vp/st) i inkubiraju u inkubatoru za uzgoj kulture stanica (1h, 37 °C). Nakon inkubacije se uklanja medij i dodaje pripremljen razrijeđen 1x vrući SB pufer zagrijan na 96 °C (200  $\mu\text{L}$ ) kako bi se uzrokovala liza stanica te se pomoću sterilne strugalice lizirane stanice odvoje od podloge za rast. Ukupni volumen se prebacuje u mikroeprevete. Stanični se lizat za SDS-PAGE priprema na način da se prvo sonicira u tri intervala po 5 sekundi (amplituda 30 Hz) te potom zagrijava na 96 °C. Između svakog intervala uzorci se hlade 5 sekundi na ledenom bloku, a između soniciranja svakog uzorka potrebno je obrisati sondu alkoholom. Tako pripremljeni uzorci spremni su za nanošenje na gel.

Proteini u uzorcima razdvajaju se diskontinuiranom elektroforezom pomoću dva gela. Gel za sabijanje koristi se kako bi se uzorci koncentrirali, dok se u gelu za razdvajanje proteini u uzorcima razdvajaju na temelju razlike u veličini. Gelovi se pripremaju u Falcon epruvetama prema točno određenom sastavu (Tablica 5). Prvo se priprema gel za razdvajanje u ukupnom volumenu od 10 ML, izlijeva se u kalup te nadslojava etanolom kako bi se osigurala ravnomjernost gela. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje (potrebno 1 h) priprema se gel za razdvajanje sastava prikazanog u Tablici 5 (3 mL) i izlijeva se u kalup na gel za razdvajanje. Nakon izlijevanja gela sa sabijanje u kalup se uranja češljic i ostavlja 1 h kako bi se polimerizirao gel za sabijanje.

Nakon završetka polimerizacije gela, češljic se izvadi iz gela za sabijanje, sastavi se aparatura za elektroforezu i priprema 1x SDS pufer u kojem se provodi elektroforeza. Pufer se izlijeva u kadicu za elektroforezu i zatim stavlja kalup sa gelovima. U prostor između gelova se potom dodaje pufer staklenom pipetom do vrha. Uzorci zagrijani na 96 °C nanose se Hamilton iglom u jažice u volumenu od 25  $\mu\text{L}$ . U jednu jažicu se dodaje 1,5  $\mu\text{L}$  proteinskog markera za određivanje molekulske mase razdvojenih proteina, a u prazne jažice se dodaje 25  $\mu\text{L}$  1x razrijeđenog SB pufera. Elektroforeza se prvih 30 minuta provodi pri 80 V, a nakon ulaska proteina u gel za razdvajanje, pri 100 V otprilike 2 h. Nakon provedene elektroforeze vrši se transfer proteina iz gela na membranu.

**Tablica 5.** Priprema gela korištenih za razdvajanje proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom

Komponente	Volumen (mL)	
	Gel za sabijanje, pH=6,8	Gel za razdvajanje, pH=8,8
reH <sub>2</sub> O	2,1	4,0
akrilamid/bisakrilamid miks 30 %	0,5	3,3
pufer Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	0,38	-
pufer Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M)	-	2,5
10 % APS	0,03	0,1
10 % SDS 0,03 0,1	0,03	0,1
TEMED 0,003 0,00	0,003	0,004
Ukupno	3	10

### 3.2.6. Western blot

Western blot je metoda za identifikaciju proteina u smjesi proteina koja se temelji na vezanju specifičnog antitijela na ciljani protein. Nakon provedene SDS-PAGE, proteini se iz gela prebacuju na nitroceluloznu membranu mokrim transferom. Transfer započinje pripremom sustava za transfer koji se redom sastoji od spužvice, dva Whatman papira, gela, nitrocelulozne membrane, zatim ponovno dva Whatman papira i spužvice, zajedno posloženih u kalup s rupama. Prijenos proteina odvija se u transfer puferu, pri 400 mA, 45 V tijekom 90 minuta. Nakon provedenog prijenosa proteina, membrana se ispiru u TBST puferu 5 minuta te potom boja otopinom Amidocrne boje 2 minute. Membrana se zatim ispiru otopinom za odbojavanje 3 puta po 2 minute na klackalici, odnosno dok se ne pojave jasne vrpce uz što svjetliji ostatak membrane. Nakon odbojavanja, membrana se ispiru u TBST puferu 30 minuta (jednom 15 min pa tri puta po 5 min), a zatim blokira u 5 %-tnoj otopini mlijeka u prahu u TBST puferu sat vremena pri sobnoj temperaturi na klackalici, čime se sprječava nespecifično vezanje protutijela na membranu. Nakon blokiranja membrana se inkubira preko noći na +4 °C u otopini primarnog

protutijela koje se priprema u 5 %-tnoj otopini mlijeka u prahu u puferu TBST. Sljedeći dan se membrana ispiru 30 minuta (jednom 15 min pa 3 puta po 5 min) i inkubira se 2 sata na sobnoj temperaturi na klackalici u otopini odgovarajućeg sekundarnog protutijela koja se priprema u 5 %-tnoj otopini mlijeka u prahu u puferu TBST. Ponovno slijedi ispiranje u TBST puferu 30 minuta (jednom 15 min pa tri puta po 5 min). Vizualizacija proteina temelji se na generiranju kemiluminiscentnog signala, a omogućena je vezanjem sekundarnog protutijela jer ono na sebi ima vezan enzim peroksidazu izoliranu iz hrena. Nakon zadnjeg ispiranja membrane, membrana se stavlja na foliju i prenosi u uređaj za snimanje membrana. Na membranu se nakapava prethodno pripremljen kemiluminiscentni reagens Pierce ECL Western analyzing Substrate i na mjestima ciljanog proteina na membrani se razvija kemiluminiscentni signal. Za detekciju više različitih proteina sličnih veličina na istoj membrani potrebno je između svake detekcije ukloniti vezana protutijela. Vezana protutijela se uklanjaju inkubiranjem u puferu za uklanjanje vezanih protutijela (engl. stripping pufer) tijekom 45 minuta pri sobnoj temperaturi na klackalici. Zatim slijedi blokiranje u 10 %-tnoj otopini mlijeka u prahu u TBST puferu te inkubiranje u otopinama odgovarajućih primarnih i sekundarnih protutijela prema opisanom postupku. Za analizu kemiluminiscentnih signala koristi se program ImageJ.

### 3.2.6. Određivanje krivulje rasta kultura stanica

Krivulja rasta kultura stanica izrađuje se na temelju vrijednosti udvostručenja populacije tijekom pet ciklusa presađivanja. Prilikom svakog presađivanja stanične kulture, potrebno je odrediti ukupan broj stanica brojanjem na Bürker-Türkovoju komorici. Za izračun udvostručenja populacije (engl. Population Doubling, PD) tijekom jednog ciklusa uzgoja koristi se formula  $PD = [\log_{10}(NH) - \log_{10}(N1)] / \log_{10}(2)$ , gdje je N1 broj nasađenih stanica, a NH vrijednost izbrojanih stanica na kraju ciklusa uzgoja. PD vrijednost daje uvid u porast broja stanica u odnosu na početni broj nasađenih stanica. Zbrajanjem PD vrijednosti svakog ciklusa uzgoja dobivaju se kumulativne vrijednosti udvostručenja stanične populacije (CPD), pomoću kojih se izrađuje krivulja rasta kultura stanica.

### 3.2.7. Imunofluorescencija

Za određivanje signala unutarstaničnih proteina koristi se imunofluorescencija. Stanice se nasaduju na stakalca prethodno smještenim u bunariće pločice za uzgoj stanica s 24 bunarića (MW24) u koncentraciji  $2 \times 10^4$  stanica po bunariću i uzgajaju se 48 sati u inkubatoru za uzgoj stanične kulture. Nakon 48 sati, stanice iz jednog bunarića se broje u Bürker-Türkovoju komorici kako bi se izračunao potreban volumen virusnog razrjeđenja za infekciju kako bi MOI iznosio  $10^5$  vp/st. Zatim slijedi infekcija dodatkom 300  $\mu$ L virusnog razrjeđenja u mediju i inkubacija 2 sata u inkubatoru, nakon čega se virusno razrjeđenje zamjenjuje svježim medijem DMEM/10 % FBS. Inficirane stanice se zatim ispiru dva puta sa PBS-om i fiksiraju s 2% PFA/PBS 12 minuta pri sobnoj temperaturi. Stanice se potom ispiru 2 puta sa PBS-om i inkubiraju s detergentom 0,1 % TritonX-T/PBS (300  $\mu$ L) 2 min na sobnoj temperaturi. TritonX-100/PBS permeabilizira stanice i time omogućava ulazak protutijela u stanice. Zatim se stanice dva puta ispiru u PBS-u i blokiraju s 3% BSA/PBS 30 min pri sobnoj temperaturi. Blokiranjem stanica se sprječava nespecifično vezanje protutijela. Stanice se potom inkubiraju u otopini primarnog protutijela specifičnog za ciljni protein koje se priprema u 5% BSA u PBS puferu (70  $\mu$ L) 1 h pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije stanice se ispiru tri puta PBS-om i inkubiraju 1 h u otopini sekundarnog protutijela specifičnog za primarno protutijelo u 5% BSA/PBS (70  $\mu$ L). Sekundarno protutijelo obilježeno je fluorescentnom bojom Alexa Fluor 546 (AF-546). Slijedi ispiranje četiri puta sa PBS-om i mqH<sub>2</sub>O pa uklapanje u medij za uklapanje s DAPI (3,5  $\mu$ L). DAPI je fluorescentna boja koja se veže na regije bogate adeninom i timinom u DNA, stoga se koristi za vizualizaciju jezgre u stanicama. Ovako pripremljeni uzorci spremni su za analizu konfokalnom mikroskopijom. Konfokalnom mikroskopijom vizualizirani su signali jezgre pomoću DAPI ( $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 405$  nm;  $\lambda_{\text{emisija}} = 410$ -480 nm) i signali unutarstaničnih proteina IFI16 i MyD88 pomoću AF546 (AF546;  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 546$  nm;  $\lambda_{\text{emisija}} = 555$  nm).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj klatrina na prijenos signala MAP kinaznog puta te ulogu proteina MyD88 i IFI16 u prepoznavanju infekcije HAdV26. U tu svrhu korištene su adherentne stanice adenokarcinoma pluća čovjeka A549, i klonovi sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69 dobiveni transfekcijom A549 stanica plazmidom pI(shCLTC) koji kodira za shRNA klatrina. Svim staničnim linijama određena je krivulja rasta na temelju četiri ciklusa presađivanja. HAdV26 je umnožen u komplementirajućim HEK-293-K1 stanicama i pročišćen na jastučiću i gradijentu CsCl. Pročišćenim adenovirusima određena je koncentracija i provjerena uspješnost transdukcije protočnom citometrijom.

Za određivanje utjecaja klatrina na prijenos signala MAP kinaznog puta proučavana je aktivacija kinaza ERK i p38 nakon infekcije HAdV26. U svrhu određivanja aktivacije proteina provedeno je razdvajanje proteina SDS-PAGE i detektiranje aktiviranih oblika kinaza Western blot metodom pomoću specifičnih protutijela. Aktivacija proteina prikazana je kao relativna ekspresija fosforiliranog (aktivirani) oblika proteina u odnosu na nefosforilirani (ukupni) oblik proteina. Na temelju dobivenih rezultata u A549 stanicama i u klonovima sa smanjenom ekspresijom klatrina, izveden je zaključak o utjecaju klatrina na aktivaciju kinaza p38 i ERK MAPK signalnog puta. Ispitivanje uloge klatrina u prepoznavanju infekcije HAdV26 putem MyD88 i IFI16 proteina praćeno je konfokalnom mikroskopijom pomoću fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela koja detektiraju primarna protutijela specifična za proučavane proteine. Praćena je njihova unutarstanična lokalizacija koja se razlikovala između inficiranih i neinficiranih stanica.

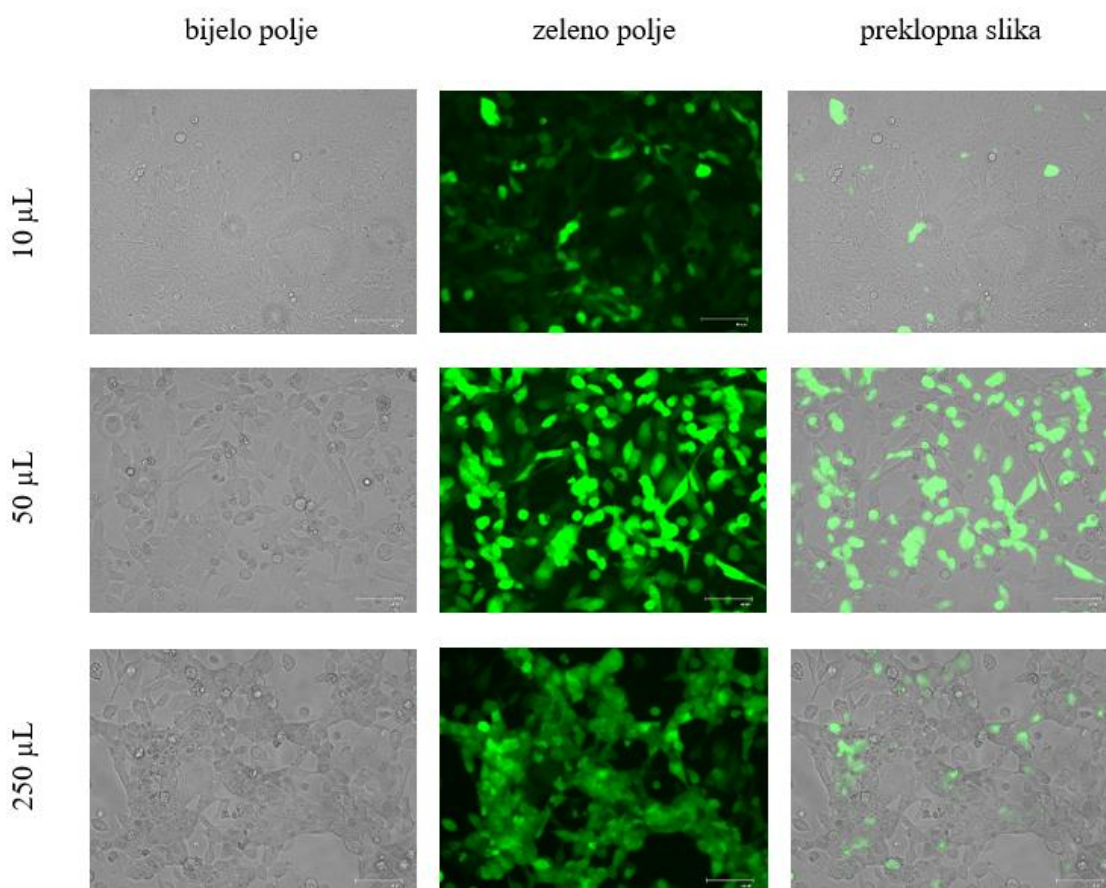
### 4.1. NAMNAŽANJE I PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSA

U ovom radu korišten je replikacijski defektan vektor HAdV26 koji ima ugrađen gen za zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP). Adenovirusni vektor umnožen je u komplementirajućim HEK-293-K1 stanicama koje u svom genomu sadrže E1 područje adenovirusnog genoma. Infekcija stanica s HAdV26 poboljšana je jer stanice HEK-293-K1 imaju stabilno povećanu ekspresiju integrina  $\alpha\beta_3$ , za kojeg je pokazano da je receptor HAdV26 (Nestić i sur., 2018). Replikacijski defektni vektori umnažani su do pojave citopatogenog učinka (CPU) koji se uočava zaokruživanjem stanica te njihovim odvajanjem od podloge 2-4 dana

nakon infekcije.

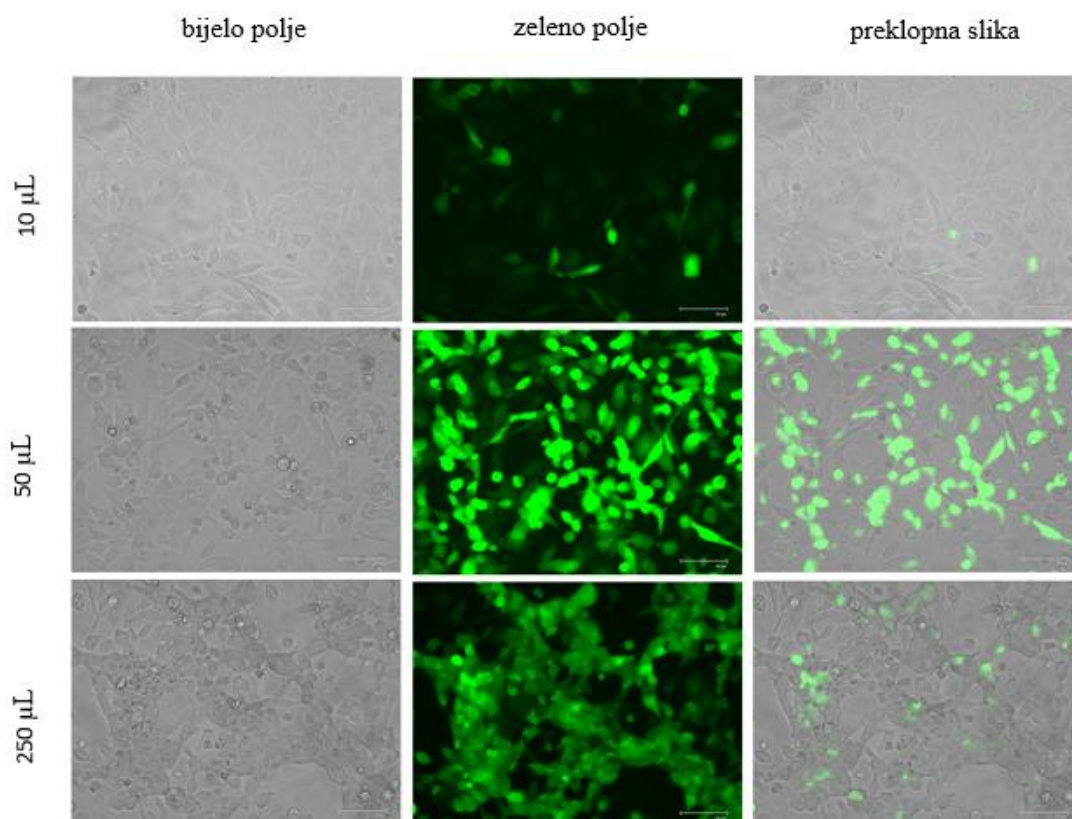
U svrhu titracije prethodno pripremljenog supernatanta infekcije koji će se koristiti za infekciju stanica s ciljem umnožavanja HAdV26, tri Petrijeve zdjelice promjera 10 cm s HEK-293-K1 stanicama inficirane su volumenima 10, 50 i 250  $\mu\text{L}$ . Tijek infekcije stanica u svrhu titracije supernatanta infekcije praćen je EVOS Cell Imaging sustavom.

Na slici 4 prikazane su inficirane stanice 24 sata nakon infekcije. Uspješno inficirane stanice fluoresciraju zeleno obzirom na to da je došlo do uspješne ekspresije transgena, GFP-a. Tijekom prvih 24 sata nije vidljiv citopatogeni učinak. Uspješnost infekcije najlošija je u stanicama inficiranim s 10  $\mu\text{L}$  supernatanta infekcije, dok je najbolja u stanicama inficiranim s 250  $\mu\text{L}$  supernatanta infekcije što je posljedica veće količine adenovirusnih vektora.



**Slika 4.** Praćenje infekcije stanica virusnim česticama HAdV26 pomoću EVOS Cell Imaging sustava 24 sata nakon infekcije s 10, 50 i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije. Prikazano je bijelo polje gdje se vide obrisi stanica, zeleno polje koje je rezultat fluorescencije GFP-a te preklopni prikaz

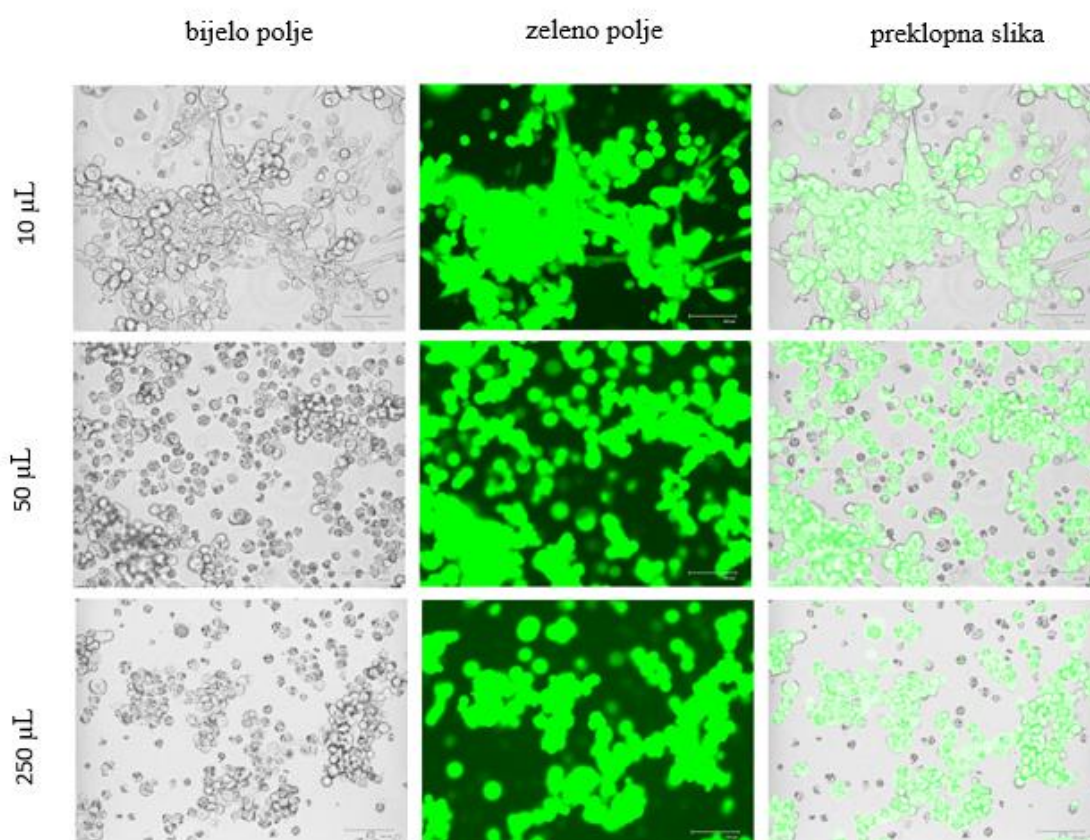
Na slici 5 prikazan je izgled stanica 48 sati nakon infekcije. Intenzitet fluorescencije porastao je u usporedbi sa stanicama snimljenim 24 sata nakon infekcije što ukazuje na uspješnu replikaciju, sklapanje adenovirusnih čestica te širenje infekcije na okolne stanice. U stanicama inficiranim s 50  $\mu\text{L}$  i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije uočava se zaokruživanje pojedinih stanica te odvajanje od podloge, što je pokazatelj citopatogenog učinka.



**Slika 5.** Praćenje infekcije stanica virusnim česticama HAdV26 pomoću EVOS Cell Imaging sustava 48 sati nakon infekcije s 10, 50 i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije. Prikazano je bijelo polje gdje se vide obrisi stanica, zeleno polje koje je rezultat fluorescencije GFP-a te preklopni prikaz

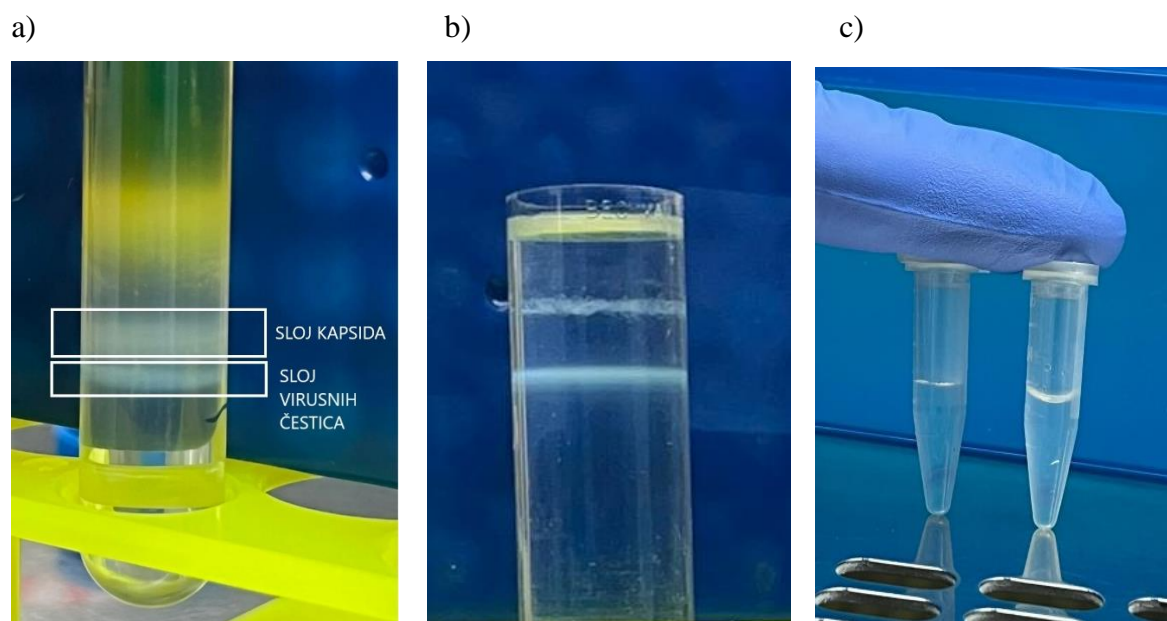


Izgled stanica 72 sata nakon infekcije prikazan je na slici 6. U stanicama inficiranim s 10  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije došlo je do pojave citopatogenog efekta manjeg intenziteta u usporedbi sa stanicama inficiranim s 50  $\mu\text{L}$  i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije. U stanicama inficiranim s 50  $\mu\text{L}$  i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije došlo je potpunog citopatogenog učinka te su sve stanice zaokružene, odvojene od podloge i formiraju nakupine u mediju. Također, intenzitet fluorescencije raste s vremenom pa je tako najveći 72 sata nakon infekcije stanica. Iz preklapnih slika vidljivo je da je došlo do infekcije gotovo svih stanica.



**Slika 6.** Praćenje infekcije stanica virusnim česticama HAdV26 pomoću EVOS Cell Imaging sustava 72 sata nakon infekcije s 10, 50 i 250  $\mu\text{L}$  supernatanta virusne infekcije. Prikazano je bijelo polje gdje se vide obrisi stanica, zeleno polje koje je rezultat fluorescencije GFP-a te preklopni prikaz

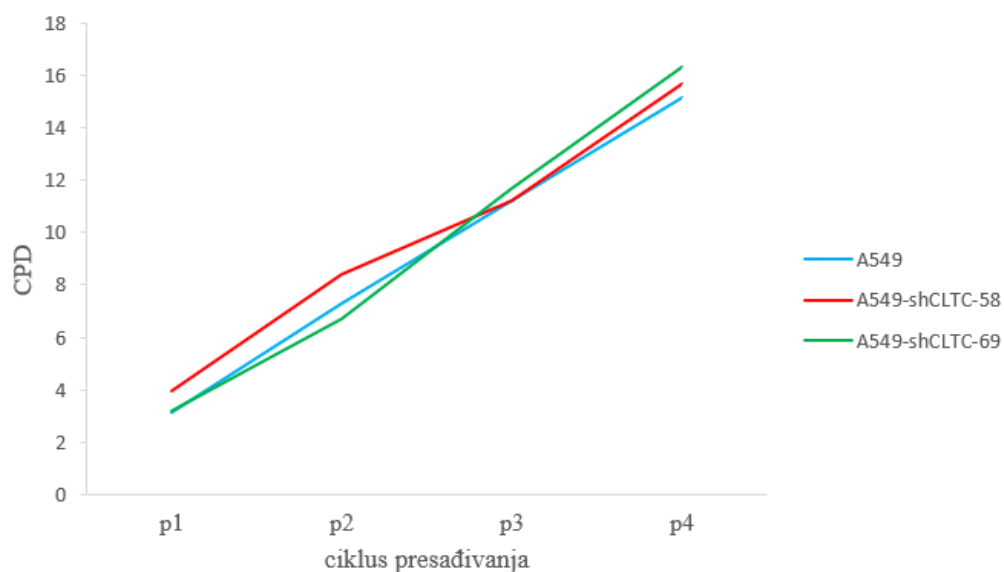
Na temelju rezultata titracije supernatanta virusne infekcije određena je optimalna količina virusa (30  $\mu$ L) i optimalno vrijeme pojave citopatogenog učinka (72 sata) pri kojima se provelo umnažanje adenovirusnih vektora korištenih u daljnim eksperimentima. U svrhu umnažanja HAdV26 uzgojeno je 60 Petrijevih zdjelica HEK-293-K1 koje su potom inficirane s 30  $\mu$ L supernatanta virusne infekcije te skupljene 72 sata nakon infekcije. Pročišćavanje adenovirusnih vektora opisano je u poglavlju 3.2.2., a provedeno je centrifugiranjem u jastučiću i gradijentu CsCl. Na slici 7 a) prikazana je epruveta nakon centrifugiranja u jastučiću CsCl, a na slici 7 b) epruveta nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl. Rezultat centrifugiranja adenovirusa u jastučiću CsCl je koncentriranje čestica u dvije bijele vrpce pri čemu su u gornjoj vrpci sadržane prazne kapside i nečistoće dok donja vrpca odgovara uspješno sklopljenim adenovirusnim česticama. Centrifugiranjem u gradijentu CsCl virusne čestice formiraju oštar bijeli sloj. Nakon centrifugiranja, CsCl se iz otopine pročišćenog virusa uklanja gel filtracijom pomoću kolone Sephadex G-25M i skupljaju se eluati pročišćenog virusa. Na slici 7 c) vidljiva je razlika između eluata u kojem nije sadržan pročišćen virus (lijevo) i eluata u kojem je sadržan pročišćen virus (desno). Površina eluata bogatog virusnim česticama je konkavnog oblika.



**Slika 7.** Proces pročišćavanja adenovirusa. a) Rezultat centrifugiranja na jastučiću CsCl vidljiv u obliku dvije bijele vrpce. Sloj praznih kapsida nalazi se iznad sloja virusnih čestica. Virusne čestice zadržane su na granici različitih gustoća CsCl. b) Rezultat centrifugiranja u jastučiću CsCl vidljiv je kao oštri bijeli sloj virusnih čestica. c) Razlika između eluata bogatog pročišćenim virusom (desno) i eluata koji ne sadrži pročišćeni virus (lijevo)

## 4.2. KRIVULJE RASTA KULTURA STANICA A549, A549-shCLTC-58 I A549-shCLTC-69

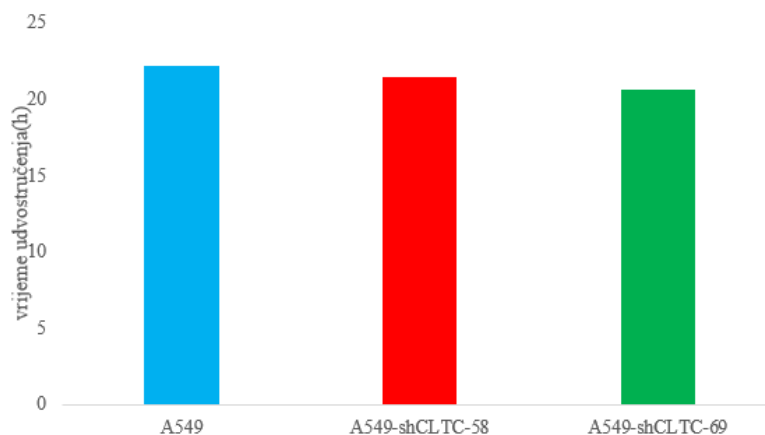
Na temelju izračunatih vrijednosti udvostručenja populacije (engl. *population doubling*, PD) te određenih vrijednosti kumulativnih udvostručenja populacije (engl. *cumulative population doubling*, CPD) izrađuje se krivulja rasta za pojedinačne stanične kulture (slika 8).



**Slika 8.** Kumulativno udvostručenje staničnih kultura (CPD) A549, A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69 nakon 4 ciklusa presađivanja

Sve stanične linije su u svrhu određivanja krivulje rasta uzgajane u mediju DMEM s dodatkom 10 % FBS u inkubatoru za uzgoj stanične kulture. Tijekom četiri ciklusa presađivanja A549 stanice su se udvostručile 15,2 puta. Stanice klona sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina A549-shCLTC-58 (ekspresija klatrina smanjena 26 %) su se tijekom četiri ciklusa presađivanja udvostručile 15,7 puta, a stanice klona sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina A549-shCLTC-69 (ekspresija klatrina smanjena 65 %) udvostručile su se 16,3 puta. Ciklusi presađivanja iznose 3 ili 4 dana, a ukupnost svih ciklusa na temelju kojih su se izrađivale krivulje rasta iznosi 14 dana.

Iz dobivenih CPD vrijednosti izračunato je vrijeme potrebno za jedno udvostručenje stanične kulture (slika 9).



**Slika 9.** Vrijeme udvostručenja za stanične linije redom A549 (22,2 sata), A549-shCLTC-58 (21,5 sata) i A549-shCLTC-69 (20,6 sata)

Iz dobivenih rezultata vidljiva je razlika u vremenu potrebnom za jedno udvostručenje stanične kulture između A549 stanica i klonova sa stabilno utišanim klatrinom; vrijeme udvostručenja A549 stanica najviše je te iznosi 22,2 sata, dok je najkraće vrijeme uočeno kod A549-shCLTC-69 stanicama te iznosi 20,6 sati. Vrijeme jednog udvostručenja A549-shCLTC-58 stanica iznosi 21,5 sati.

Ovim podacima pokazano je da, u usporedbi s A549 stanicama, oba klonova u kraćem vremenu udvostruče staničnu populaciju. Za klonove je poznato da imaju povećanu količinu  $\alpha\beta3$  integrina u odnosu na A549 stanice (Nestić i sur., 2022). Integrini imaju ulogu u adheziji stanica, proliferaciji, diferencijaciji i migraciji (Moreno-Layseca i Streuli, 2014) te se vežu za mnoge komponente ekstracelularnog matriksa (Humphries i sur., 2006). Na temelju navedenog, stanične linije A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69 s povećanom količinom  $\alpha\beta3$  integrina pokazuju kraće vrijeme udvostručenja stanične kulture u usporedbi s A549 stanicama. Obzirom da se volumen virusnog razrjeđenja potreban za infekciju stanica određivao na temelju MOI vrijednosti, odnosno broju virusnih čestica po stanici, razlika u vremenu udvostručavanja populacije različitih staničnih linija ne utječe na pokuse jer je tijekom infekcije u svakoj staničnoj liniji jednak broj virusnih čestica po stanici.

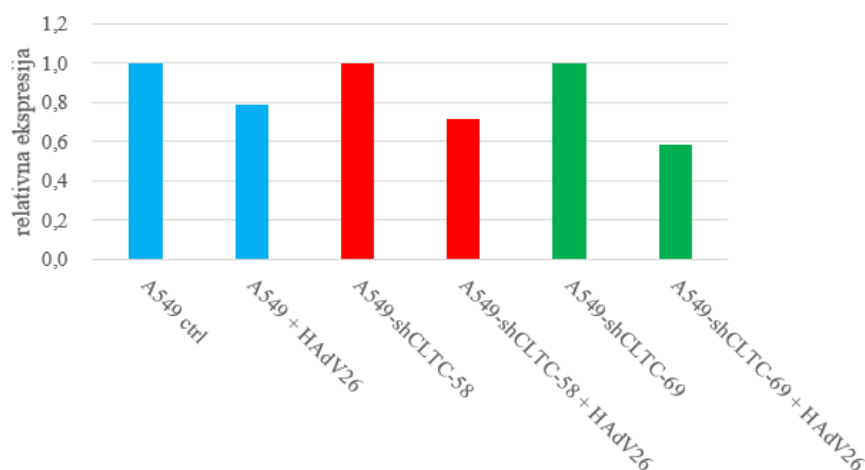
### 4.3. ULOGA KLATRINA U PRIJENOSU SIGNALA MAP KINAZNOG PUTA NAKON INFEKCIJE HAdV26

U svrhu ispitivanja uloge klatrina u prijenosu signala MAP kinaznog puta nakon infekcije HAdV26 koristile su se A549 stanice te klonovi sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69. Smanjena ekspresija klatrina u staničnim linijama klonova uzrokuje povećanu ekspresiju  $\alpha\beta3$  integrina u odnosu na A549 stanice, za kojeg je pokazano da je nužan za uspješnu infekciju epitelnih stanica s HAdV26 (Nestić i sur., 2018). Utišavanje klatrina povećava uspješnost transdukcije s HAdV26, pri čemu je najveća uspješnost transdukcije uočena kod klonova A549-shCLTC-69 koji ima najnižu ekspresiju klatrina i najveću ekspresiju  $\alpha\beta3$  integrina (Nestić i sur., 2022).

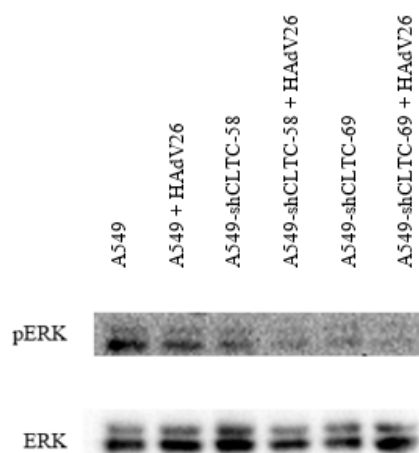
Kako bi se istražila uloga klatrina u prijenosu signala MAP kinaznog puta, proučavala se aktivacija MAP kinaza ERK i p38 nakon infekcije HAdV26. Obzirom da se aktivacija svih MAP kinaza očituje fosforilacijom, količina aktiviranog oblika ispitivanih MAP kinaza normalizirala se prema nefosforiliranom obliku proteina.

Utvrđeno je da infekcija HAdV26 ne utječe na aktivaciju MAP kinaze ERK u A549 stanicama. Također, kod klonova sa smanjenom ekspresijom klatrina nije uočena aktivacija MAP kinaze ERK nakon infekcije HAdV26, već je uočeno smanjenje aktivacije ERK u usporedbi s A549 stanicama (slika 10).

a)



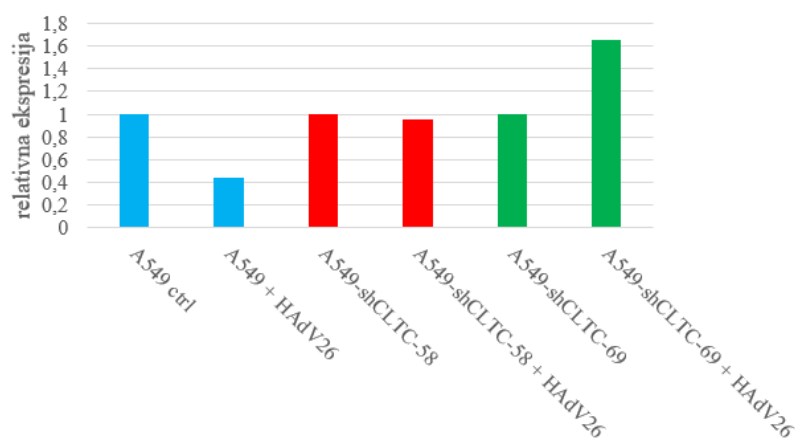
b)



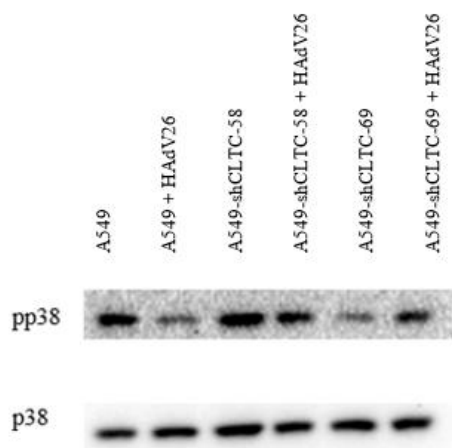
**Slika 10.** (a) Relativna ekspresija fosforiliranog oblika proteina ERK (pERK) u odnosu na nefosforilirani oblik ERK u stanicama A549, A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69 nakon infekcije adenovirusom HAdV26. Stanične linije su inficirane virusom (MOI  $10^4$ ) i inkubirane (1h, 37 °C) nakon čega su stanice skupljene metodom vrućeg pufera. Proteini su razdvojeni metodom SDS-PAGE i analizirani Western blotom. Količina aktivnog oblika ERK normalizirana je prema količini nefosforiliranog oblika proteina. Relativna ekspresija aktivnog oblika ERK u inficiranim staničnim linijama prikazana je u odnosu na odgovarajuće neinficirane stanične linije i navedena je broičano ispod kemiluminiscentnog signala proteinske vrpce. (b) Kemiluminiscentni signali vrpce za pERK (gornja slika) i ERK (donja slika)

Proučavanjem proteina p38 u A549 i A549-shCLTC-58 stanicama primijećeno je da infekcija HAdV26 nema utjecaj na aktivaciju ove kinaze. Za razliku od A549 i A549-shCLTC-58 stanica, u A549-shCLTC-69 staničnoj liniji uočena je aktivacija p38 nakon infekcije HAdV26 vidljiva kao porast količine pp38 1,7 puta u odnosu na neinficirane A549-shCLTC-69 stanice (slika 11).

a)



b)



**Slika 11.** (a) Relativna ekspresija fosforiliranog oblika proteina p38 (pp38) u odnosu na nefosforilirani oblik p38 u stanicama A549, A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69 nakon infekcije adenovirusom HAdV26. Stanične linije su inficirane virusom ( $MOI 10^4$ ) i inkubirane (1h, 37C) nakon čega su stanice skupljene metodom vrućeg pufera. Proteini su razdvojeni metodom SDS-PAGE i analizirani Western blotom. Količina aktivnog oblika ERK normalizirana je prema količini nefosforiliranog oblika proteina. Relativna ekspresija aktivnog oblika p38 u inficiranim staničnim linijama prikazana je u odnosu na odgovarajuće neinficirane stanične linije i navedena je brojačno između prikaza kemiluminiscentnih signala proteinskih vrpca. (b) Kemiluminiscentni signali vrpca za pp38 (gornja slika) i p38 (donja slika)

Poznato je da ispitivani klonovi imaju povećanu količinu  $\alpha\beta 3$  integrina koji HAdV26 koristi kao receptor za ulazak u stanicu, stoga je transdukcija veća u klonovima u usporedbi s A549 stanicama (Nestić i sur., 2022). No, rezultati ukazuju da nakon infekcije HAdV26 ne dolazi do aktivacije MAPK signalnog puta, odnosno da infekcija HAdV26 ne okida prijenos signala putem ERK kinaze ni u jednoj od promatranih staničnih linija, neovisno o ekspresiji klatrina. Povećana transdukcija u klonovima koji imaju smanjenu ekspresiju klatrina i povećanu ekspresiju  $\alpha\beta 3$  integrina uzrokuje povećanu aktivaciju kinaze p38 u odnosu na A549 stanice. Međutim, promatranjem svake stanične linije pojedinačno i usporedno s neinficiranim stanicama, povećana aktivacija kinaze p38 vidljiva je samo u klonu A549-shCLTC-69, koji od svih staničnih linija ima najvišu ekspresiju integrina  $\alpha\beta 3$ .

Provedena su mnoga istraživanja aktivacije MAP kinaznog puta preko kinaza p38 i ERK te njihove uključenosti u imunski odgovor stanice nakon infekcije adenovirusima različitih skupina. Tibbles i sur. (2002) pokazali su da infekcija s HAdV5 uzrokuje aktivaciju MAP kinaza ERK i p38 u epitelnim stanicama bubrega 20 minuta nakon infekcije, a održava se i do 3 sata nakon infekcije. Povezanost aktivacije ERK i p38 s ekspresijom kemokina IP-10 uslijed infekcije s HAdV5 potvrđena je inhibicijom MAP kinaza kemijskim agensima te posljedično smanjenom ekspresijom IP-10. Inhibicijom bijega iz endosoma potvrđena je ovisnost aktivacije ERK i p38 te ekspresije IP-10 o bijegu adenovirusa iz endosoma. Također, pokazano je da je ekspresija IP-10, uslijed infekcije HAdV5, neovisna o interakciji virusa s receptorima CAR i integrinima. Iako se pokazalo da aktivacija kinaze p38 ima važniju ulogu u imunskom odgovoru stanica na infekciju HAdV5 od aktivacije proteina ERK, uočeno je sinergističko djelovanje dvaju proteina, a njihova uključenost u imunski odgovor stanica u navedenom radu pokazana je i *in vivo* u miševima. Također, Smith i sur. (2011) pokazali su uključenost kinaza ERK i p38 u imunski odgovor na HAdV2 *in vivo* u miševima. Uslijed infekcije HAdV2 dolazi do aktivacije ERK i p38 te povećanja ekspresije citokina i kemokina. Smanjenje aktivacije ERK i p38 te ograničena ekspresija citokina nakon *in vivo* infekcije termo-osjetljivim mutantom HAdV2-ts1, koji nema sposobnost bijega iz endosoma, navode na zaključak se da se signalni putevi ERK i p38 kinaza okidaju tijekom ili nakon bijega adenovirusa u citosol. Iako je dokazano da je povećanje citokina posljedica aktivacije ERK i p38, njihova inhibicija uzrokuje relativno nisko smanjenje ekspresije nekih citokina. Inhibicija ERK minimalno je smanjila ekspresiju citokina TNF- $\alpha$  i kemokina KC te povećala ekspresiju IL-6, IL-12p70, IP-10 i IFN $\gamma$ , dok je nakon inhibicije p38 kinaze uočeno smanjenje ekspresije IFN $\gamma$ , IL-10 i IL-1 $\beta$  (Smith i sur., 2011). Ovi rezultati upućuju na povezanost ekspresije citokina i kemokina i s drugim signalnim



putevima.

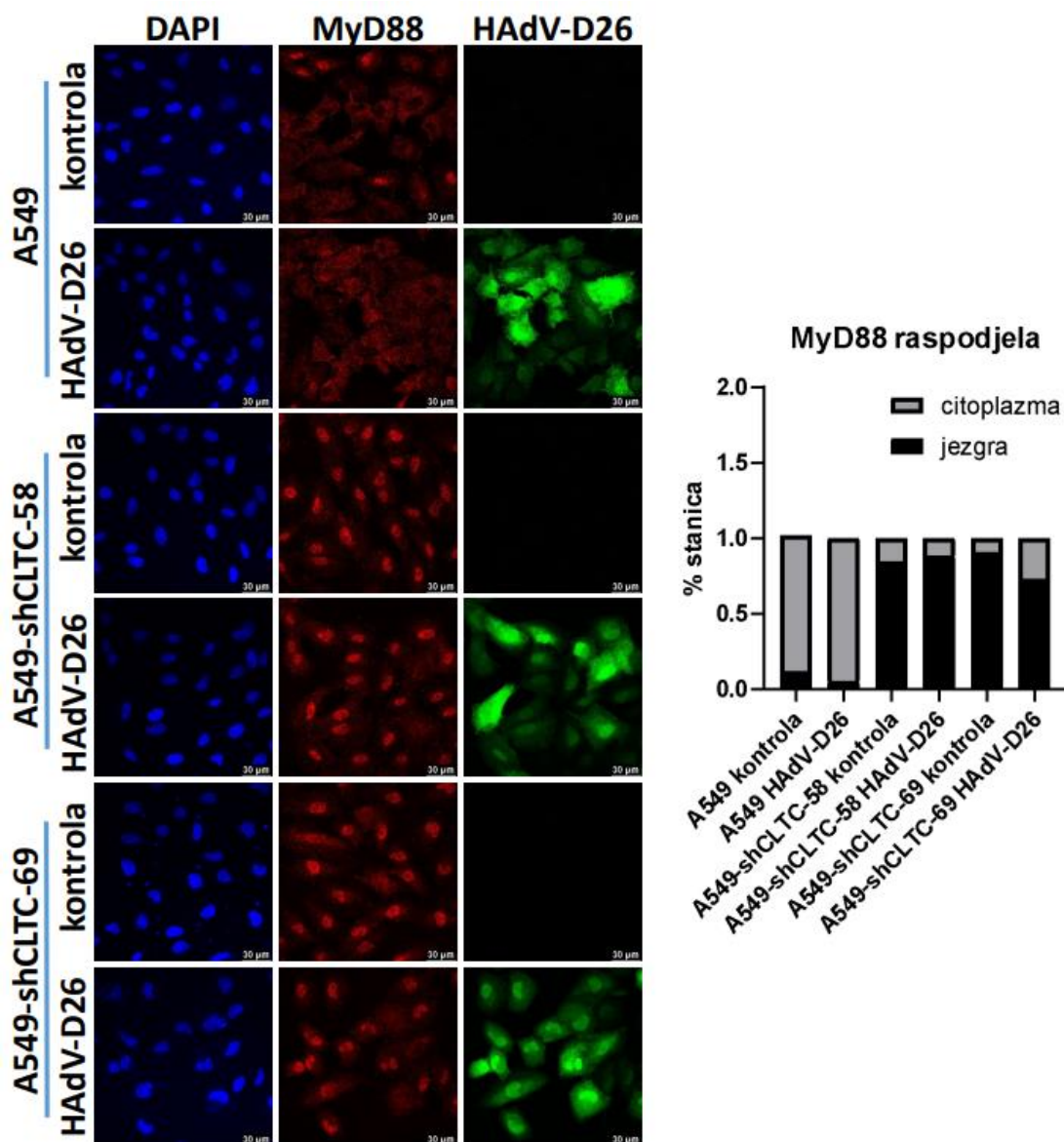
Proučavanjem imunskog odgovora epitelnih stanica na infekciju s HAdV7, Qi i suradnici (2020) uočili su aktivaciju signalnog puta p38/NF- $\kappa$ B i ekspresiju kemokina IL-6. U istraživanju su korištene bronhijalne epitelne stanične linije, HeLa stanice te primarna stanična linija epitela dišnog puta čovjeka. Budući da je kod pojedinaca zaraženih HAdV7 uočeno povećanje ekspresije IL-6, provedena su *in vitro* istraživanja na temelju kojih je zaključeno da infekcija s HAdV7 potiče fosforilaciju NF- $\kappa$ B i njegovu translokaciju u jezgru. Takva promjena lokalizacije proteina omogućava vezanje za protomor gena IL-6 te aktivaciju ekspresije.

Nestić i suradnici (2022) pokazali su smanjenje aktivacije kinaze ERK u A549 stanicama 1 sat nakon infekcije HAdV26. Također, nisu uočili utjecaj infekcije adenovirusom HAdV26 na aktivaciju kinaze p38, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom diplomskom radu. Budući da utjecaj infekcije HAdV26 na aktivaciju signalnih puteva uključenih u urođeni imunski odgovor epitelnih stanica nije proučavan, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se bolje shvatio odgovor stanice na infekciju. Zbog određenih razlika u građi, korištenja različitih receptora za ulazak u stanicu te različitog unutarstaničnog putovanja adenovirusa različitih grupa, aktiviraju se različiti signalni putevi koji drugačijim mehanizmima potiču imunski odgovor stanice.

#### **4.4. ULOGA KLATRINA U PREPOZNAVANJU INFEKCIJE HAdV26 POMOĆU PROTEINA MYD88 I IFI16**

U svrhu istraživanja uloge klatrina u prepoznavanju infekcije HAdV-26 pomoću MyD88 i IFI16 konfokalnom se mikroskopijom uspoređivao signal proteina nakon infekcije u A549 stanicama te klonovima sa smanjenom ekspresijom klatrina. Imunofluorescencija je metoda koja omogućava vizualizaciju proteina pomoću specifičnih fluorescentnih protutijela. Nakon infekcije staničnih linija uzgojenih na stakalcima u pločicama za uzgoj stanica provedena je priprema stanica za imunofluorescenciju opisana u poglavlju 3.2.7. i analiza konfokalnom mikroskopijom. Signal proteina obilježenog fluorescentnom bojom AF546 u stanicama inficiranim HAdV26 (MOI  $10^4$ , 1 h, 37 °C) uspoređen je sa signalom proteina u neinficiranim stanicama u promatranim staničnim linijama.

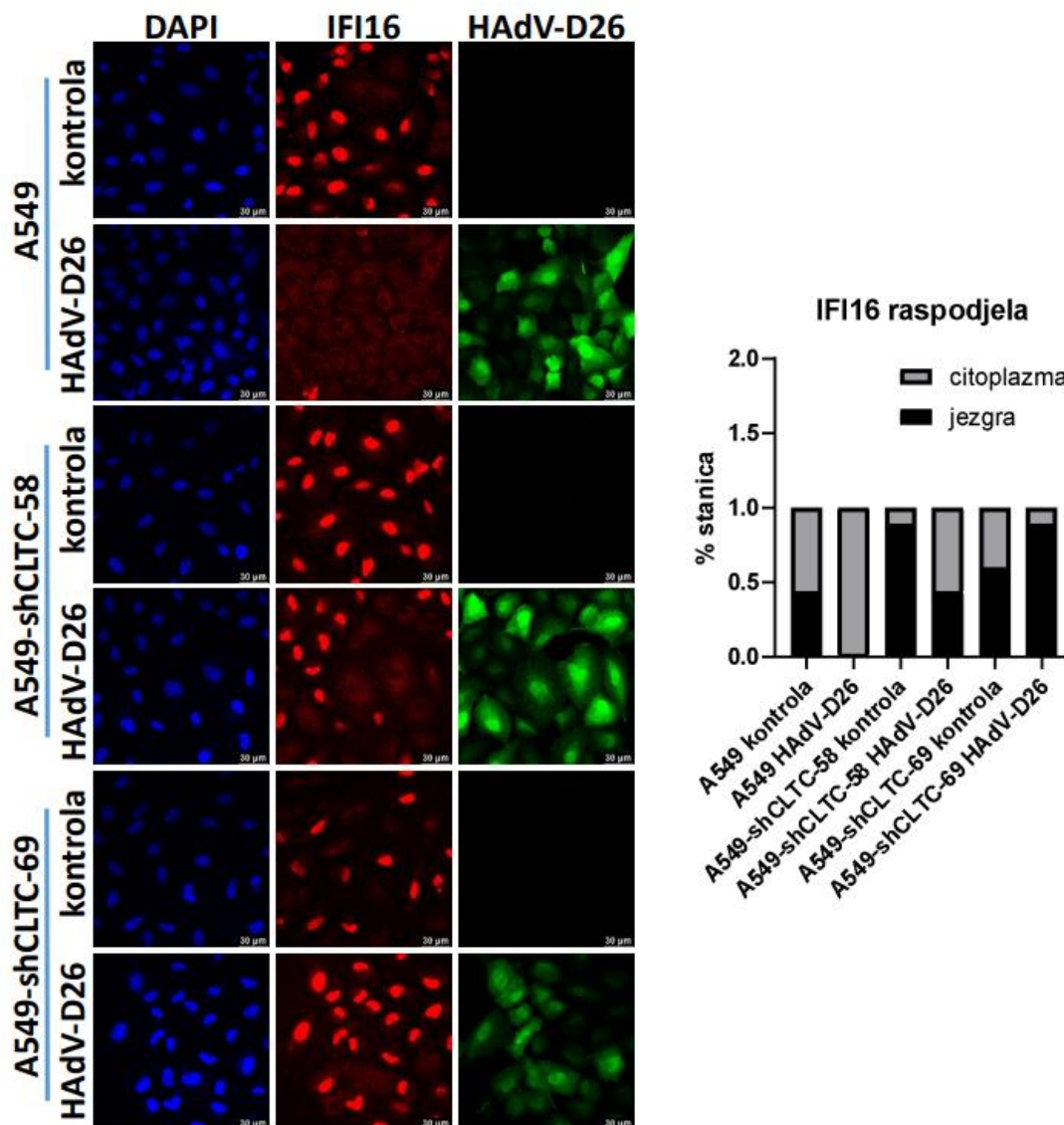
Iz rezultata prikazanih na slici 12 vidljivo je da je većina proteina MyD88 u neinficiranim A549 stanicama prisutna u citoplazmi, dok tek pojedine stanice pokazuju signal proteina u jezgri. Također, vidljivo je da infekcija s HAdV26 u A549 stanicama potiče transport MyD88 iz jezgre u citoplazmu. U klonovima A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69 uočena je lokalizacija MyD88 proteina većinom u jezgri. Nakon infekcije u A549-shCLTC-58 stanicama nije uočen transport MyD88 u citoplazmu, dok je u A549-shCLTC-69 stanicama uočen povećan transport MyD88 iz jezgre u citoplazmu.



**Slika 12.** Signali jezgre, proteina MyD88 i HAdV26 dobiveni konfokalnom mikroskopijom. Jezgre su prethodno tretirane DAPI bojom te imaju svojstvo plave fluorescencije (DAPI:  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 405 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 410\text{-}480 \text{ nm}$ ), signal proteina MyD88 vidljiv je zbog sekundarnih protutijela obilježenih fluorescentnom bojom AF546 (AF546:  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 546 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 555 \text{ nm}$ ) koja detektiraju primarna protutijela specifična za MyD88. U svakoj promatranoj staničnoj liniji, gornji red prikazuje tri snimana kanala s lijeva prema desno: signal jezgre, signal proteina MyD88 i signal HAdV26 u neinficiranim stanicama dok donji red prikazuje jednaka tri kanala snimana u stanicama inficiranim HAdV26 (MOI  $10^4$ , 1h, 37 °C)

Kao što je opisano u poglavlju 2.4., MyD88 je adapterski protein koji vezanjem za citoplazmatsku regiju TLR sudjeluje u aktivaciji signalnih puteva koji omogućuju aktivaciju imunskog odgovora stanice ekspresijom upalnih citokina i interferona tipa I (El-Zayat i sur., 2019). Rezultati koji upućuju na povećanu lokalizaciju MyD88 u citoplazmi (uočeno u A549 i A549-shCLTC-69, nakon infekcije) u skladu su s dosadašnjim saznanjima o povezanosti MyD88 i mehanizma prepoznavanja adenovirusa opisanim u poglavlju 2.4. Zhu i suradnici (2007) pokazali su da infekcija adenovirusom potiče ekspresiju interferona tipa I u plazmocitoidnim dendritičkim stanicama *in vitro* i *in vivo* u miševima. Smanjenje ekspresije interferona tipa I nakon infekcije u dendritičkim stanicama koje ne eksprimiraju protein MyD88, potvrđuje važnost TLR9 receptora i adaptoru MyD88 u prepoznavanje adenovirusa te aktivaciji imunskog odgovora. MyD88 može sudjelovati u aktivaciji ekspresije interferona tipa I putem signalnih puteva neovisnih o NF- $\kappa$ B, što može uključivati njegovu lokalizaciju u jezgri. Aktivirani protein MyD88 ulazi u interakcije s transkripcijskim faktorom IRF1 i transportira se u jezgru gdje aktivira ekspresiju IFN $\beta$ , sintaze dušikova oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) i interleukina IL-12p35 (O'Neill i sur., 2007, Negishi i sur., 2006). Lokalizacija MyD88 u jezgri uočena u staničnim linijama klonova A549-shCLTC-58 i A549-shCLTC-69 može biti posljedica aktivacije imunskog odgovora potaknuta interakcijom MyD88 i IRF1.

Iz rezultata prikazanih na slici 13 uočena je podjednaka lokalizacija proteina IFI16 u jezgri i citoplazmi u A549 stanicama. Također, transport IFI16 proteina u citoplazmu vidljiv je u gotovo svim A549 stanicama nakon infekcije. Rezultati dobiveni analizom stanica klonova razlikuju se od rezultata dobivenih analizom A549 stanica; u neinficiranim klonovima uočena je veća lokalizacija proteina IFI16 u jezgri u odnosu na A549 stanice pri čemu je udio stanica s IFI16 lokaliziranim u jezgri najveći kod klona A549-shCLTC-58 te iznosi gotovo 100 %. Uz to, vidljiv je i različit utjecaj infekcije HAdV26 na lokalizaciju IFI16 u stanicama klonova. Kod A549-shCLTC-58 uočen je sličan utjecaj infekcije kao kod A549 stanica, ali u manjem omjeru. Povećana lokalizacija proteina IFI16 u jezgri nakon infekcije HAdV26 uočena je u stanicama klona A549-shCLTC-69 pri čemu je lokalizacija u jezgri vidljiva u gotovo svim stanicama.



**Slika 13.** Signali jezgre, proteina IFI16 i HAdV26 dobiveni konfokalnom mikroskopijom. Jezgre su prethodno tretirane DAPI bojom te imaju svojstvo plave fluorescencije (DAPI:  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 405 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 410\text{-}480 \text{ nm}$ ), signal proteina IFI16 vidljiv je zbog sekundarnih protutijela obilježenih fluorescentnom bojom AF546 (AF546:  $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 546 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisija}} = 555 \text{ nm}$ ) koja detektiraju primarna protutijela specifična za IFI16. U svakoj promatranoj staničnoj liniji, gornji red prikazuje tri snimana kanala s lijeva na desno: signal jezgre, signal proteina IFI16 i signal HAdV26 u neinficiranim stanicama, dok donji red prikazuje jednaka tri snimana kanala u stanicama inficiranim HAdV26 (MOI  $10^4$ , 1h, 37 °C)

Provedena su brojna istraživanja o uključenosti DNA senzora IFI16 u antivirusni odgovor stanica. IFI16 je većinom lokaliziran u jezgri stanice (ovisno o tipu stanice), no ima sposobnost transporta između jezgre i citoplazme te prepoznavanja dsDNA i u jezgri i u citoplazmi (Veeranki i sur., 2012). Mehanizam aktivacije imunskog odgovora potaknut interakcijom IFI16 i virusnog genoma uslijed infekcije adenovirusima relativno je neistražen u usporedbi s drugim DNA virusima, primjerice herpesvirusima.

Nakon vezanja unutarstanične dsDNA, IFI16 stupa u interakciju sa STING adapterskim proteinom u citoplazmi stanice i time potiče ekspresiju IFN $\beta$  opisanu u poglavlju 2.4 (Unterholzner i sur., 2010). Aktivacija IFN antivirusnog odgovora potaknuta interakcijom IFI16 s virusnim genomom uočena je u epitelnim stanicama rožnice miša, monocitima, primarnim fibroblastima i makrofagima nakon infekcije virusom Herpesa simplex tip 1 (HSV-1) (Unterholzner i sur., 2010; Conrady i sur., 2012; Orzalli i sur., 2012; Horan i sur., 2013). Osim uključenosti IFI16 u antivirusni odgovor putem aktivacije IFN $\beta$ , uočena je aktivacija imunskog odgovora posredovana inflamatomom ovisnim o ASC adapterskom proteinu (engl. *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (CARD)*). Uslijed infekcije herpesvirusima (HSV-1, KSHV (engl. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*), EBV (virus Epstein-Barr)), IFI16 prepoznaje virusni genom u jezgri i tvori kompleks koji se sastoji od IFI16, ASC adapterskog proteina i enzima kaspaze-1 (Kerur i sur., 2011; Ansari i sur., 2013; Singh i sur., 2013). Kompleks se zatim otpušta u citoplazmu, gdje kaspaza-1 proteolitički aktivira IL-1 $\beta$  i IL-18.

U istraživanju Zhao i suradnika (2009), pokazana je uključenost IFI16 proteina u antivirusni odgovor primarnih fibroblasta uslijed infekcije HAdV12. Uočena je aktivacija interferon stimulirajućih gena (engl. *interferon-stimulated genes, ISG*), među kojima je i IFI16 u kasnoj fazi infekcije (66 h nakon infekcije). Praćenjem unutarstaničnog putovanja različitih grupa adenovirusa s markerima ranog i kasnog endosoma, u A549 stanicama uočeno je da HAdV26 manje efikasno putuje do jezgre od adenovirusa HAdV5 (Teigler i sur., 2014). HAdV5 pokazuje minimalnu akumulaciju u ranom i kasnom endosomu te je poznat po vrlo efikasnom transportu do perinuklearnog područja (Greber i sur., 1993; Leopold i sur., 1998), dok je za HAdV26 poznato da zaostaje u kasnom endosomu i 2 h nakon infekcije, što ukazuje da za to vrijeme nema povećanog nakupljanja virusa u perinuklearnom području ili jezgri stanice (Teigler i sur., 2014). Prisutnost adenovirusne DNA u citoplazmi moguća je posljedica pogrešnog transporta adenovirusnog genoma u jezgru. U istraživanju Wang i suradnika (2013) pokazan je značajan postotak neuspjelog transporta adenovirusnog HAdV5 genoma u jezgru stanica (25%  $\pm$ 13%

neuspješno transportirane DNA), pri čemu slobodna DNA biva otpuštena u citoplazmu, gdje ju citosolni IFI16 može prepoznati i aktivirati imunosni odgovor. Transport IFI16 iz jezgre u citoplazmu nakon infekcije HAdV26 (uočeno u A549 i A549-shCLTC-58 stanicama) može biti posljedica aktivacije IFN $\beta$  te IL-1  $\beta$  i IL-18 putem prethodno opisanih mehanizama uočenih nakon infekcije HSV-1. Kako bi se objasnio transport IFI16 senzora iz citoplazme u jezgru nakon infekcije HAdV26 uočen u stanicama s najmanjom ekspresijom klatrina (A549-shCLTC-69) potrebna su daljnja istraživanja.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Utišavanje klatrina nema utjecaj na aktivaciju MAP kinaze ERK nakon infekcije s HAdV26 u stanicama A549 i klonovima sa stabilno utišanim klatrinom. Aktivacija MAP kinaze p38 uočena je u staničnoj liniji klona s najmanjom ekspresijom klatrina (A549-shCLTC-69) nakon infekcije s HAdV26.

2. Utišavanje klatrina potiče lokalizaciju proteina MyD88 u jezgru stanice što upućuje na ulogu MyD88 u aktivaciji signalnih puteva neovisnih o NF- $\kappa$ B. Nakon infekcije s HAdV26, dolazi do povećane lokalizacije MyD88 u citoplazmi stanica A549 i klona s najmanjom ekspresijom klatrina (A549-shCLTC-69).

3. Utišavanje klatrina aktivira transport DNA senzora IFI16 iz jezgre u citoplazmu stanica A549 i A549-shCLTC-58 nakon infekcije s HAdV26, što korelira s mehanizmima prepoznavanja infekcije pomoću IFI16 uslijed infekcije s drugim, proučavanijim DNA virusom (HSV-1). U staničnoj liniji klona s najmanjom ekspresijom klatrina (A549-shCLTC-69) uočen je transport IFI16 iz citoplazme u jezgru nakon infekcije s HAdV26. Potrebna su daljna istraživanja kako bi se objasnio točan mehanizam prepoznavanja infekcije adenovirusima pomoću IFI16 te utjecaj utišavanja klatrina na isti.



## 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. *J Virol* **81**, 4654-4663. <https://doi.org/10.1128/JVI.02696-06>

Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR (2018) Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol* **9**, 2379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>

Amstutz B, Gastaldelli M, Kälin S, Imelli N, Boucke K, Wandeler E, i sur. (2008) Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J* **27**, 956-969. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.3>

Ansari MA, Singh VV, Dutta S, Veetil MV, Dutta D, Chikoti L, i sur. (2013) Constitutive Interferon-Inducible Protein 16-Inflammasome Activation during Epstein-Barr Virus Latency I, II, and III in B and Epithelial Cells. *J Virol* **87**, 8606–8623. <https://doi.org/10.1128/JVI.00805-13>

Arnberg N, Edlund K, Kidd AH, Wadell G (2000) Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* **74**, 42-48. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.1.42-48.2000>

Arnberg N (2012) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.005>

Atasheva S, Shayakhmetov DM (2022) Cytokine Responses to Adenovirus and Adenovirus Vectors. *Viruses* **14**, 888. <https://doi.org/10.3390/v14050888>

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. *Sci Adv* **5**. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3567>

Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>

Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 50-83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>.

Conrady CD, Zheng M, Fitzgerald KA, Liu C, Carr DJ (2012) Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. *Mucosal Immunol* **5**, 173–183. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.63>

Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**, 915-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206106>.

Custers J, Kim D, Leyssen M, Gurwith M, Tomaka F, Robertson J, et al. (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>

Dimitrov DS (2004) Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **2**, 109-122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro817>

El-Zayat SR, Sibaii H, Manna FA (2019) Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* **43**, 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>

Farley DC, Brown JL, Leppard KN (2004) Activation of the Early-Late Switch in Adenovirus Type 5 Major Late Transcription Unit Expression by L4 Gene Products. *J Virol* **78**, 1782–1791. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.4.1782-1791.2004>

Fejer G, Freudenberg M, Greber UF, Gyory I (2011) Adenovirus-triggered innate signalling pathways. *Eur J Microbiol Immunol* **1**, 279-88. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.1.2011.4.3>.

Fernandes P, Silva AC, Coroadinha AS, Alves PM (2016) Upstream Bioprocess for Adenovirus Vectors. U: Curiel DT (ured.) Adenoviral Vectors for Gene Therapy, 2. izd., Academic Press, str. 139-161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800276-6.00006-1>

Fessler SP, Young CS (1998) Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection. *J Virol* **72**, 4049-56. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.5.4049-4056.1998>

Fitzgerald KA (2009) Integrating IL-1 $\alpha$  in Antiviral Host Defenses. *Immunity* **31**, 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.07.001>

Flatt JW, Butcher SJ (2019) Adenovirus flow in host cell networks. *Open Biol* **9**, <https://doi.org/10.1098/rsob.190012>

Gallardo J, Pérez-Illana M, Martín-González N, San Martín C (2021) Adenovirus Structure: What Is New? *Int J Mol Sci* **22**, 5240. <https://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>

Gonçalves MAFV, de Vries AAF (2006) Adenovirus: from foe to friend. *Rev Med Virol* **16**, 167–186. <https://doi.org/10.1002/rmv.494>

Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**, 477-486. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90382-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90382-z)

Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A (1996) The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J* **15**, 1766-1777. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00525.x>

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

Guimet D, Hearing P (2016) Adenovirus Replication. U: Curiel DT (ured.) Adenoviral Vectors for Gene Therapy, 2. izd., Academic Press, str. 59-84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800276-6.00003-6>.

Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, Kuryk L, Lipiec A, Greber UF (2014) Innate Immunity to Adenovirus. *Hum Gen Ther* **25**, 265–284. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.001>

Horan KA, Hansen K, Jakobsen MR, Holm CK, Soby S, Unterholzner L, i sur. (2013) Proteasomal Degradation of Herpes Simplex Virus Capsids in Macrophages Releases DNA to the Cytosol for Recognition by DNA Sensors. *J Immunol* **190**, 2311–2319. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202749>

Humphries JD, Byron A, Humphries MJ (2006) Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* **119**, 3901-3. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>.

Kadlecova Z, Spielman SJ, Loerke D, Mohanakrishnan A, Reed DK, Schmid SL (2017) Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *J Cell Biol* **216**, 167-179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608071>

Kälin S, Amstutz B, Gastaldelli M, Wolfrum N, Boucke K, Havenga M, i sur. (2010) Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *J Virol* **84**, 5336-50. <https://doi.org/10.1128/JVI.02494-09>

Karen KA, Hearing P (2011) Adenovirus core protein VII protects the viral genome from a DNA damage response at early times after infection. *J Virol* **85**, 4135–42. <https://doi.org/10.1128/JVI.02540-10>.

Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**, 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>

Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>

Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, Chandran B (2011) IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* **9**, 363-75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.008>.

Kleinberger T (2019) Biology of the adenovirus E4orf4 protein: from virus infection to cancer cell death. *FEBS Lett* **594**, 1891-1917. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13704>

Lane KL, Beverly LD (2005) What Does It Take to Bind CAR? *Mol Ther* **12**, 599-609. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.05.017>.

Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, i sur. (2017) Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes Dis* **4**, 43-63. <https://doi.org/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 Ophth Vis Sci* **61**, 50. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.10.50>

Lenman A, Liaci AM, Liu Y, Årdahl C, Rajan A, Nilsson E, i sur. (2015) Human adenovirus 52 uses sialic acid-containing glycoproteins and the coxsackie and adenovirus receptor for binding to target cells. *PLoS Pathog* **11**. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004657>

Leopold PL, Ferris B, Grinberg I, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG (1998) Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum Gene Ther* **9**, 367-78. <https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.3-367>.

Liszewski MK, Atkinson JP (2021) Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and pathogen connections. *Curr Opin Immunol* **72**, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.04.005>

Loustalot F, Kremer EJ, Salinas S (2015) Membrane Dynamics and Signaling of the Cocksackievirus and Adenovirus Receptor. *Int Rev Cell Mol Biol* **322**, 331-362. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.006>

Lynch J, Fishbein M, Echavarria M (2011) Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med* **32**, 494–511. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283287>

Luisoni S, Greber F (2016) Biology of Adenovirus Cell Entry. U: Curiel DT (ured.) *Biology of Adenovirus Cell Entry*, 2. izd., Academic Press, str. 27–58. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800276-6.00002-4>

Majhen D (2022) Human adenovirus type 26 basic biology and its usage as vaccine vector. *Rev Med Virol* **32**, e2338. <https://doi.org/10.1002/rmv.2338>

McKinnon KM (2018) Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol* **120**. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O’Garra A (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**, 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>

Moreno-Layseca P, Streuli CH (2014) Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biol* **34**, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.011>

Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* **158**, 1119-1131. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112067>

Meier O, Greber UF (2003) Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* **5**, 451-462. <https://doi.org/10.1002/jgm.409>

Meier O, Greber UF (2004) Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* **6**, 152-63. <https://doi.org/10.1002/jgm.553>

Mittereder N, March KL, Trapnell BC (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* **70**, 7498–7509.

<https://doi.org/10.1128/JVI.70.11.7498-7509.1996>

Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, i sur. (2006) Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15136-41.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0607181103>

Nestić D, Custers J, Švec D, Majhen D (2022) Human Adenovirus Type 26 Infection Mediated by  $\alpha\beta3$  Integrin Is Caveolin-1-Dependent. *Microbiol Spectr* **10**.

<https://doi.org/10.1128/spectrum.01097-22>

Nestić D, Božinović K, Drašković I, Kovačević A, van den Bosch J, Knežević J, i sur. (2022) Human Adenovirus Type 26 Induced IL-6 Gene Expression in an  $\alpha\beta3$  Integrin- and NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Viruses* **14**, 672. <https://doi.org/10.3390/v14040672>

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, Custers J, Majhen D (2018)  $\alpha\beta3$  Integrin is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26. *J Virol* **93**. <https://doi.org/10.1128/JVI.01474-18>

O'Neill LAJ, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**, 353–364. <https://doi.org/10.1038/nri20790>

Orzalli MH, DeLuca NA, Knipe DM (2012) Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *P Natl A Sci USA* **109**, <https://doi.org/10.1073/pnas.1211302109>

Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL (1996) A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *P Natl A Sci USA* **93**, 13565–13570. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13565>

Pelkmans L, Helenius A (2002) Endocytosis Via Caveolae. *Traffic* **3**, 311–320. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x>

Qi L, Wang Y, Wang H, Deng J (2020) Adenovirus 7 Induces Interlukin-6 Expression in Human Airway Epithelial Cells via p38/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Front Immunol* **11**, 551413. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.551413>

Radke JR, Cook JL (2018) Human adenovirus infections. *Curr Opin Infect Dis* **31**, 251-256. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000451>

Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, i sur. (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80**. [doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016)

Razani B, Woodman SE, Lisanti M (2002) Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology. *Pharmacol Rev* **54**, 431–467. <https://doi.org/10.1124/pr.54.3.431>

Russell WC (2009) Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* **90**, 1-20. <https://doi.org/10.1099/vir.0.003087-0>

Rux JJ, Kuser PR, Burnett RM (2003) Structural and Phylogenetic Analysis of Adenovirus Hexons by Use of High-Resolution X-Ray Crystallographic, Molecular Modeling, and Sequence-Based Methods. *J Virol* **77**, 9553–9566. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.17.9553-9566.2003>

San Martín C (2012) Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses* **4**, 847-877. <https://doi.org/10.3390/v4050847>



Schmid EM, McMahon HT (2007) Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* **448**, 883–888. <https://doi.org/10.1038/nature06031>

Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, Arnberg N (2003) Adenovirus Type 11 Uses CD46 as a Cellular Receptor. *J Virol* **77**, 9183–9191. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.17.9183-9191.2003>

Sharma P, Kolawole AO, Wiltshire SM, Frondorf K, Excoffon KJDA (2012) Accessibility of the coxsackievirus and adenovirus receptor and its importance in adenovirus gene transduction efficiency. *J Gen Virol* **93**, 155-158. <https://doi.org/10.1099/vir.0.036269-0>

Singh VV, Kerur N, Bottero V, Dutta S, Chakraborty S, Ansari MA, i sur. (2013) Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency in Endothelial and B Cells Activates Gamma Interferon-Inducible Protein 16-Mediated Inflammasomes. *J Virol* **87**, 4417–4431. <https://doi.org/10.1128/JVI.03282-12>

Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M, Kalin S, Boucke K, Beerli RR, i sur. (2004) The Human Membrane Cofactor CD46 Is a Receptor for Species B Adenovirus Serotype 3. *J Virol* **78**, 4454–4462. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4454-4462.2004>

Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR (2010) Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* **343**, 195-224. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_16](https://doi.org/10.1007/82_2010_16)

Smith JS, Xu Z, Tian J, Palmer DJ, Ng P, Byrnes AP (2011) The Role of Endosomal Escape and Mitogen-Activated Protein Kinases in Adenoviral Activation of the Innate Immune Response. *PLoS ONE* **6**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026755>

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

Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS (2014) The sweet spot: defining virus–sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol* **12**, 739–

749. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3346>

Strunze S, Engelke MF, Wang IH, Puntener D, Boucke K, Schleich S, 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>

Takeuchi O, Akira S (2009) Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* **227**, 75-86. [doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x)

Tanaka Y, Chen ZJ (2012) STING Specifies IRF3 Phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway. *Sci Signal* **5**. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002521>

Teigler JE, Iampietro MJ, Barouch DH (2012) Vaccination with adenovirus serotypes 35, 26, and 48 elicits higher levels of innate cytokine responses than adenovirus serotype 5 in rhesus monkeys. *J Virol* **86**, 9590-9598. <https://doi.org/10.1128/JVI.00740-12>

Teigler JE, Kagan JC, Barouch DH (2014) Late endosomal trafficking of alternative serotype adenovirus vaccine vectors augments antiviral innate immunity. *J Virol* **88**, 10354-63. <https://doi.org/10.1128/JVI.00936-14>.

Tibbles LA, Spurrell JCL, Bowen GP, Liu Q, Lam M, Zaiss AK, i sur. (2002) Activation of p38 and ERK Signaling during Adenovirus Vector Cell Entry Lead to Expression of the C-X-C Chemokine IP-10. *J Virol* **76**, 1559–1568. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1559-1568.2002>

Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, i sur. (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* **11**, 997–1004. <https://doi.org/10.1038/ni.1932>

Veeranki S, Choubey D (2012) Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: Regulation of subcellular localization. *Mol Immunol* **49**, 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.11.004>

Vlachaki T, Hernandez-Garcia A, Ittmann M, Chhikara M, Aguilar LK, Zhu X, i sur. (2002)

Impact of Preimmunization on Adenoviral Vector Expression and Toxicity in a Subcutaneous Mouse Cancer Model. *Mol Ther* **6**, 342–348. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0669>

Wang H, Li ZY, Liu Y, Persson J, Beyer I, Möller T, i sur. (2010) Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* **17**, 96-104. <https://doi.org/10.1038/nm.2270>

Wang IH, Suomalainen M, Andriasyan V, Kilcher S, Mercer J, Neef A, i sur. (2013) Tracking viral genomes in host cells at single-molecule resolution. *Cell Host Microbe* **14**, 468-80. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.09.004>.

Wold WS, Toth K (2013) Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* **13**, 421-33. <https://doi.org/10.2174/1566523213666131125095046>.

Wolfrum N, Greber UF (2013) Adenovirus signalling in entry. *Cell Microbiol* **15**, 53–62. <https://doi.org/10.1111/cmi.12053>

Wong CM, McFall ER, Burns JK, Parks RJ (2013) The role of chromatin in adenoviral vector function. *Viruses* **5**, 1500-15. <https://doi.org/10.3390/v5061500>

Woolsey C, Geisbert TW (2021) Current state of Ebola virus vaccines: A snapshot. *PLoS Pathog* **17**. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010078>.

Zhang WW (1999) Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* **6**, 113–138. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700024>

Zhang Y, Bergelson JM (2005) Adenovirus Receptors. *J Virol* **79**, 12125–12131. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12125-12131.2005>

Zhang W, Imperiale MJ (2003) Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. *J Virol* **77**, 3586-94. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.6.3586-3594.2003>

Zhao H, Boije H, Granberg F, Pettersson U, Svensson C (2009) Activation of the interferon-induced STAT pathway during an adenovirus type 12 infection. *Virology* **392**, 186-95.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.006>.

Zhu J, Huang X, Yang Y (2007) Innate Immune Response to Adenoviral Vectors Is Mediated by both Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways. *J Virol* **81**, 3170–318.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Vlastoručni potpis