

# Utjecaj utišavanja Toll sličnog receptora 9 na poticanje urođenog imunosnog odgovora nakon infekcije s adenoviralnim vektorom 26

---

Slijepčević, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:969695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# **DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, srpnja 2018.

Marijana Slijepčević

887/MB

**UTJECAJ UTIŠAVANJA TOLL  
SLIČNOG RECEPTORA 9 NA  
POTICANJE UROĐENOG  
IMUNOSNOG ODGOVORA  
NAKON INFEKCIJE S  
ADENOVIRALNIM VEKTOROM  
TIPA 26**

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

*Zahvaljujem dr.sc. Andreji Ambriović Ristov na mentorstvu, stručnom vodstvu i stvaranju poticajne radne sredine. Zahvaljujem na prenošenju znanja kroz interesanta i edukativna predavanja, koja su dovela do mog interesa za gensku terapiju.*

*Zahvaljujem dr. sc. Dragomiri Majhen na mentorstvu i vodstvu te nesebičnoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada, kao i na velikoj potpori, usmjeravanju i poticanju na učenje. Hvala za uloženo vrijeme i pomoć da naučim sve metode korištene u ovom radu. Hvala za sve motivacijske razgovore koji su mi uvijek pomogli i doveli me na ispravan put.*

*Veliko hvala Davoru Nestiću, mag. ing. mol. biotech za pomoć i savjete pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem za strpljenje, potporu i vrijeme izdvojeno za sve moje brojne upite, kao i pronalazak rješenja u svim kriznim trenucima.*

*Zahvaljujem svim djelatnicama Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala na pomoći i druženjima koja su dodatno uljepšala rad u laboratoriju.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na potpori i ohrabrenju za ostvarenje svih mojih ciljeva.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

## UTJECAJ UTIŠAVANJA TOLL SLIČNOG RECEPTORA 9 NA POTICANJE UROĐENOG IMUNOSNOG ODGOVORA NAKON INFEKCIJE S ADENOVIRALNIM VEKTOROM 26

*Marijana Slijepčević, 887/MB*

**Sažetak:** Genska terapija označava unos genskog materijala u ciljnu stanicu u svrhu terapijskog učinka, kako bi se popravio određeni poremećaj ili unijela neka nova funkcija u stanicu. Najistraživaniji adenovirus tipa 5 (AdV5) se najčešće koristi kao vektor u genskoj terapiji, no visoka seroprevalencija AdV5 predstavlja problem prilikom uporabe tog tipa vektora. Moguće rješenje ovog problema je korištenje adenovirusa sa niskom seroprevalencijom u populaciji kao što je adenovirus tipa 26 (AdV26). U ovom radu istražena je uloga Toll sličnog receptora 9 (TLR9) u poticanju urođenog imunskog odgovora u epitelnim stanicama nakon infekcije AdV26. U stanicama adenokarcinoma pluća čovjeka (A549), korištenjem specifične siRNA (*small interfering RNA*), utišan je TLR9 te su korištenjem metoda Real Time RT-PCR i ELISA određene ekspresije gena i proteina koji sudjeluju u urođenom imunskom odgovoru nakon infekcije AdV26. Dobiveni rezultati ukazuju da AdV26 nakon ulaska u stanice A549 potiče urođeni imunski odgovor. Nakon infekcije s AdV26, dobivena je povećana ekspresija gena koji kodiraju za IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$  te IFN- $\beta$ , a smanjena ekspresija gena koji kodira za IFN- $\alpha$ 1. U stanicama sa smanjenom ekspresijom TLR9 potaknut imunski odgovor bio je manji za većinu promatranih gena, u odnosu na stanice u kojima TLR9 nije bio utišan. Mogući mehanizam poticanja imunskog odgovora nakon infekcije AdV26 uključuje P-ERK i P-p38 molekule. Također je uočeno da AdV26 bolje inficira stanice sa utišanim TLR9, što do sad nije bilo poznato.

**Ključne riječi:** *adenovirus tipa 26, toll slični receptor 9, urođeni imunski odgovor*

**Rad sadrži:** stranica 79, slika 23, tablica 12, literaturna navoda 70

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, znan. savj. IRB*

**Pomoć pri izradi:** *dr. sc. Dragomira Majhen, znan. sur. IRB i Davor Nestić, mag. ing. mol. Biotech*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc.dr.sc. *Igor Stuparević*
2. doc.dr.sc. *Andreja Ambriović Ristov, znan. savj. IRB*
3. dr.sc. *Dragomira Majhen, znan. sur. IRB*
4. prof.dr.sc. *Višnja Gaurina Srček*

**Datum obrane:** 23. srpnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

### EFFECT OF SILENCING TOLL LIKE RECEPTOR 9 TO PROMOTE INNATE IMMUNE RESPONSE AFTER INFECTION WITH ADENOVIRAL VECTOR 26

*Marijana Slijepčević, 887/MB*

**Abstract:** Gene therapy refers to the entry of foreign gene material into the target cell for the purpose of therapeutic effect, in order to correct a particular disorder, or introduce a new function into the cell. The most investigated so far is adenovirus type 5 (AdV5) which is commonly used as a vector in gene therapy. High seroprevalence of AdV5 is high in the population causing a problem when using this type of vector. The possible solution is to use adenovirus whose seroprevalence is low in the population, as adenovirus type 26 (AdV26). The aim of this study is to investigate the role of Toll like receptor 9 (TLR9) in stimulating the innate immune response after AdV26 infection in epithelial cells. In human lung adenocarcinoma cells (A549), using specific interfering RNA (siRNA), TLR9 was suppressed and the level of mRNA and proteins expressed as innate immune response to AdV26 was investigated by the Real Time RT-PCR and ELISA methods. The obtained results indicate that AdV26 after entering the A549 cells promotes the innate immune response. After infection with AdV26, there was obtained increased expression of genes encoding for IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$  and IFN- $\beta$ , and decreased expression of the gene encoding for IFN- $\alpha$ 1. In cells with silenced TLR9 there was reduced immune response, the response was lower for most of the investigated genes compared to cells where TLR9 was not suppressed. Possible mechanism of promoting innate immune response after AdV26 infection includes P-ERK and P-p38. Moreover, the results show that AdV26 is better transduced in cells with silenced TLR9, which so far has not been reported.

**Keywords:** *Adenovirus tyoe 26, toll like receptor 9, innate immune response*

**Thesis contains:** pages 79, figures 23, tables 12, references 70

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, Senior scientist IRB, Assistant professor PBF*

**Technical support and assistance:** *dr. sc. Dragomira Majhen, research associate, IRB and Davor Nestić, mag. ing. mol. Biotech*

#### Reviewers:

1. PhD *Igor Stuparević*, Assistant professor PBF
2. PhD *Andreja Ambriović-Ristov*, Senior scientist IRB, Assistant professor PBF
3. PhD. *Dragomira Majhen*, Research associate IRB
4. PhD. *Višnja Gaurina Srček*, Associate professor

**Thesis defended:** 23 July 2018

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. STRUKTURA ADENOVIRUSA.....	4
2.2. ORGANIZACIJA ADENOVIRUSNOG GENOMA.....	6
2.3 VEZANJE I ULAZAK ADENOVIRUSA U STANICU .....	7
2.4. IZLAZAK ADENOVIRUSA IZ ENDOSOMA I PUTOVANJE DO JEZGRE .....	10
2.5. ADENOVIRUSI I POTICANJE IMUNOSNOG ODGOVORA NAKON INFEKCIJE.....	10
2.6. ADENOVIRALNI VEKTORI .....	14
2.6.1. Adenovirus tipa 26 .....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI.....	19
3.1.1. Osnovne kemikalije.....	19
3.1.2. Puferi i otopine .....	20
3.1.3. Stanične linije.....	21
3.1.4. Replikativno defektni adenovirusi .....	21
3.1.5. Početnice .....	21
3.1.6. Ostali materijali .....	21
3.1.7. Uređaji i pomagala .....	22
3.1.8. Protutijela .....	24
3.1.9. siRNA i shRNA molekule.....	24
3.2. METODE.....	25
3.2.1. Uzgoj stanica .....	25
3.2.2. Odmrzavanje stanica .....	25
3.2.3. Održavanje stanica .....	25
3.2.4. Zamrzavanje stanica.....	25
3.2.5. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa centrifugiranjem u cezijevom kloridu	26
3.2.6. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa.....	27
3.2.7. siRNA posredovano utišavanje TLR9 receptora u A549 staničnoj liniji.....	27
3.2.8. Određivanje uspješnost transdukcije adenovirusom .....	28
3.2.9. Izdvajanje ukupne RNA iz kulture stanica.....	29



3.2.10. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće RNA.....	29
3.2.11. Obrnuto prepisivanje ukupne RNA.....	29
3.2.13. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE.....	31
3.2.14. Western blot .....	34
3.2.15. Određivanje specifičnih antigena ELISA testom (Sandwich ELISA) .....	34
3.2.16. Transfekcija i izdvajanje stabilno transficiranih staničnih linija.....	35
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	37
4.1. siRNA POSREDOVANO UTIŠAVANJE TLR9 PROTEINA.....	39
4.2. PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSA .....	40
4.3. UTIŠAVANJE TLR9 POVEĆAVA USPJEŠNOST TRANSDUKCIJE AdV26 ....	42
4.4. UTJECAJ UTIŠAVANJA TLR9 NA EKSPRESIJU GENA UKLJUČENIH U UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR NAKON INFEKCIJE AdV26 .....	43
4.4.1. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodiraju za IL-6 i IL-8.....	45
4.4.2. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodiraju za IL-18 i IL-1 $\beta$ .....	48
4.4.3. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodiraju za IFN- $\alpha$ 1 i IFN- $\beta$ ..	50
4.4.4. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodira za MyD88.....	52
4.5. UTJECAJ UTIŠAVANJA TLR9 NA LUČENJE IL-6 I IL-8 U SUPERNATANT INFICIRANIH STANICA.....	53
4.6. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA KOJI SUDJELUJU U AKTIVACIJI GENA UKLJUČENIH U IMUNOSNI ODGOVOR.....	56
4.7. STABILNA TRANSFEKCIJA A549 STANICA PLAZMIDOM KOJI SADRŽI sh(TLR9) I IZDVAJANJE KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM TLR9 ....	61
5. ZAKLJUČCI .....	65
6. LITERATURA.....	67
7. PRILOZI.....	78

## **1. UVOD**

Genska terapija je postupak kojim se u stanicu unosi genski materijal s ciljem postizanja terapijskog učinka, pri čemu se genski materijal u stanicu može unijeti viralnim ili neviralnim putem. S obzirom na razvoj metoda manipulacije virusnog genoma, adenovirusi su postali primamljivi kandidati za razvoj vektora namijenjenih prijenosu gena, vakcinaciju ili onkolitičkoj terapiji. Adenoviralni vektori su najviše korišteni virusni vektori, a najčešće se koriste za prijenos gena u kliničkim pokusima genske terapije tumora i infekcija (za razvoj vakcina) te u neurološkim i metaboličkim bolestima. Problem prilikom korištenja adenoviralnih vektora je visoka prevalencija neutralizacijskih protutijela prema uobičajenim serotipovima adenovirusa u ljudi, čime se onemogućava ekspresija transgena unesenog vektorom (Curiel, 2016). Jedan od trenutno istraživanih pristupa pronalaska rješenja je konstrukcija vektora na osnovi neučestalih serotipova adenovirusa. Najbolje istražen adenovirus je adenovirus tipa 5 (AdV5) te su vektori bazirani na adenovirusu tipa 5 najčešće korišteni. Zbog prisutnosti neutralizacijskih protutijela na AdV5, istražuju se drugi serotipovi adenovirusa, pri čemu je jedan od obećavajućih kandidata adenovirus tipa 26 (AdV26) (Li i sur., 2012).

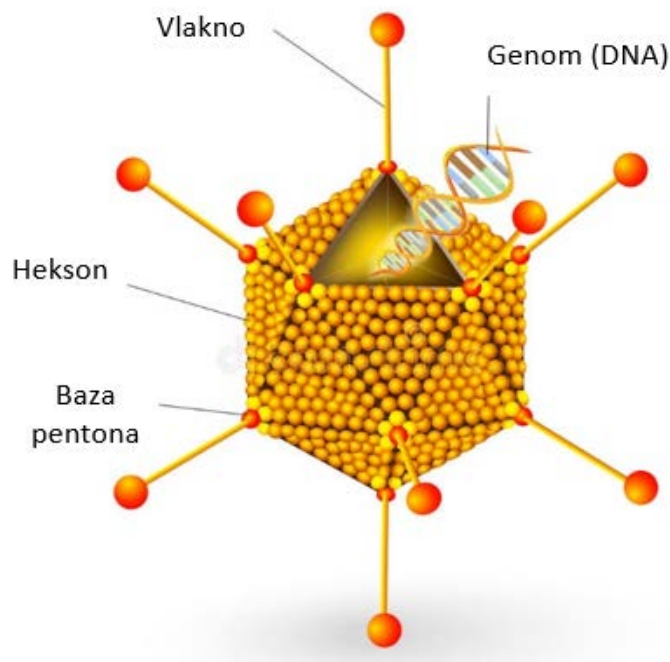
Cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati ulogu Toll sličnog receptora 9 (TLR9) u imunosnom odgovoru epitelnih stanica nakon infekcije AdV26. U odabranoj staničnoj liniji, A549, korištenjem specifične siRNA je smanjena ekspresija TLR9 receptora. Određena je uspješnost transdukcije AdV26 na stanicama A549, sa i bez utišavanja TLR9 receptora korištenjem protočnog citometra. Osim toga, određena je razinu ekspresije gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru stanice metodom lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja, kao i proteina izlučenih u supernatant stanica ELISA metodom. Analizirana je i razina ekspresije proteina koji sudjeluju u aktivaciji transkripcije istraživanih citokina i kemokina.

## **2. TEORIJSKI DIO**

Adenovirusi (AdV) su virusi koji pripadaju obitelji *Adenoviridae*, rodu *Mastadenovirus*, a prvi put su otkriveni sredinom 20. stoljeća prilikom pokušaja uzgoja adenoidnog tkiva u laboratoriju (Rowe i sur., 1953). Poznato je više od šezdeset serotipova koji su podijeljeni u podgrupe od A do G (Huang, 2013). Određivanje serotipova zasniva se na nekoliko osobina: filogenetskoj udaljenosti, organizaciji genoma, udjelu nukleotida (GC%), onkogenosti, rasponu domaćina koje inficiraju, krosneutralizaciji, mogućnosti za rekombinacijom, broju gena koji kodiraju za virus-povezanu RNA i hemaglutinaciji. Infekcije adenovirusima uzrokuju blage respiratorne, okularne i probavne bolesti kod ljudi, poput febrilnog respiratornog katra, faringokonjunktivalne groznice, keratokonjuktivitisa ili gastroenteritisa (Majhen i sur., 2014; Ryu, 2017). Kod pacijenata sa slabim imunitetom AdV mogu uzrokovati teže infekcije (Lynch i sur., 2011). Adenovirusi ne pokazuju onkogeni potencijal u ljudi.

## **2.1. STRUKTURA ADENOVIRUSA**

Struktura adenovirusne čestice je vrlo složena i sastoji se od ikozaedralne kapside unutar koje se nalazi dvolančana DNA. Adenovirusi ne sadrže ovojnicu (engl. *envelope*), a promjer im iznosi 70 do 100 nm (Brenner, 2001). Slika 1. prikazuje shemu strukture adenovirusa. Kapsida ima 20 strana trokutastog oblika, 30 rubova i 12 vrhova. Viralna kapsida je sastavljena od 252 kapsomere, 240 heksona i 12 pentona. Pentamerni protein baza pentona formira individualnu kapsomeru na 12 vrhova, gdje svaka kapsomera podupire trimerno proteinsko vlakno varijabilne veličine, nekovalentno vezano za vrh kapside. U bazi pentona gotovo svih adenovirusa, osim serotipova 40 i 41, prisutan je RGD slijed (Arg-Gly-Asp) (Brenner, 2001).



Slika 1. **Shematski prikaz strukture adenovirusa.** Na shemi su prikazani proteini kapside: hekson, baza pentona i vlakno, te genom adenovirusa koji se nalazi unutar kapside (preuzeto i prilagođeno iz <<https://www.shutterstock.com/image-vector/adenovirus-morphology-adenoviruses-most-commonly-cause-160235651>>).

Vlakno adenovirusa sastavljeno je od tri odvojene regije: N-kraja ili domene rep kojim se vlakno nekovalentno veže za bazu pentona, središnjeg dijela s varijabilnim brojem ponavljanja pri čemu broj ponavljanja utječe na duljinu vlakna i ovisi o serotipu adenovirusa (od 5 ponavljanja u AdV3 do 22 u AdV5), te C-kraja koji se smatra u globularnu domenu glave oblika propelera i odgovoran je za interakcije s različitim receptorima na površini stanice. O duljini vlakna ovisi njegova fleksibilnost. Uz navedene glavne proteine kapside (heksone, penton i vlakno), kapsidu čine i četiri manja kapsidna proteina, proteini IIIa, VI, VIII, IX. Manji kapsidni proteini služe za stabilizaciju kapside te sudjeluju u sklapanju virusne čestice kod replikacije virusa, a imaju ulogu i u ulasku virusa u stanicu domaćina (Curiel, 2016). Događaji u kojima sudjeluju navedeni proteini odvijaju se nakon internalizacije, poput izlaska adenovirusa iz endosoma, transkripcijske aktivnosti, i nuklearne organizacije. Dodatni proteini u jezgi kapside (proteini V, VII, i X i terminalni protein) u interakciji su s viralnom DNA, kako bi se olakšao transport genoma u jezgu

inficirane stanice (Lion, 2014). Popis proteina koji grade adenovirusnu česticu nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1. Popis strukturnih proteina adenovirusne čestice.

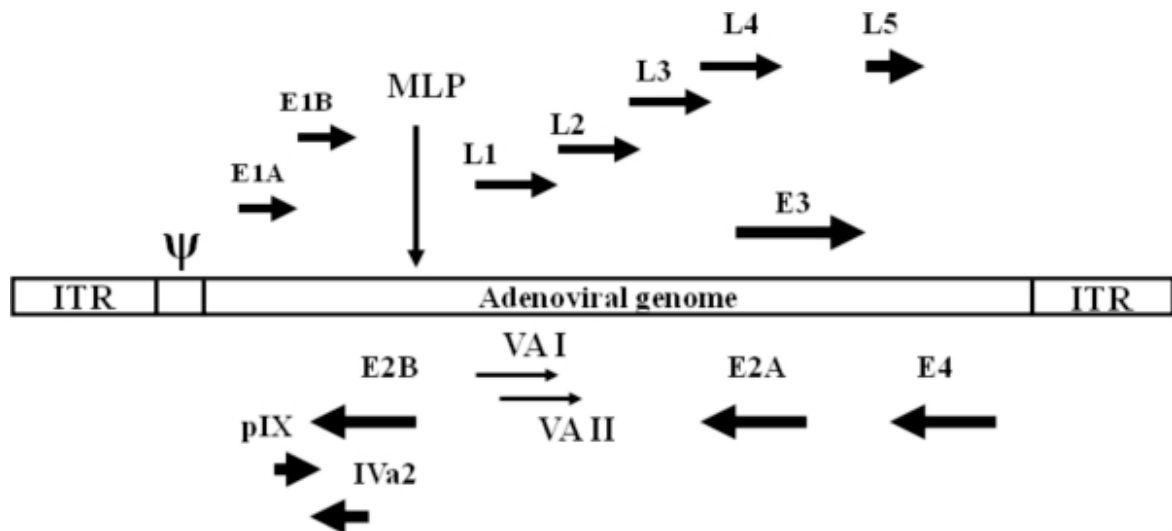
Kapsida	
Hekson (II)	
Baza pentona (III)	240 trimera, temeljni protein kapside
Vlakno (IV)	12 pentamera, temeljni protein kapside
IIIa	12 trimera, temeljni protein kapside
VI	60 monomera proteina vezanog za hekson
XIII	protein vezan za hekson, 60 heksamera
IX	protein vezan za hekson
	protein vezan za hekson, 80 heksamera
Srž	
V	DNA-vezujući protein
VII	DNA-vezujući protein
Mu (X)	19 aminokiselina dugačak DNA-vezujući protein
TP	terminalni protein

## 2.2. ORGANIZACIJA ADENOVIRUSNOG GENOMA

Adenovirusni genom kodira za oko 40 proteina, a veličina genoma iznosi između 34 i 37 kb. Svi adenovirusi imaju sličnu organizaciju genoma, pri čemu su regije unutar genoma podijeljene na ranu, srednju, i kasnu (Slika 2.). Viralne transkripcijske jedinice kodiraju multiple mRNA molekule koje su nastale alternativnim prekrajanjem primarnog RNA transkripta. Rana regija genoma uljučuje četiri obitelji transkripta, od E1 do E4, koje su potrebne za viralnu replikaciju. E1A predstavlja transkripcijski neposredno-ranu regiju genoma, E1B, E2, E3 i E4 su definirani kao rani transkripcijski dijelovi, pri čemu je E3 transkripcijska jedinica visoko divergentna između različitih serotipova AdV i kodira za proteine koji moduliraju imunosni odgovor stanice domaćina. Srednji geni predstavljaju dva transkripta, IX i IVa2, dok kasna regija označava pet transkripcijskih obitelji, uključenih u proizvodnju zrelih virusa. Glavni promotor koji omogućava transkripciju kasnih proteina je glavni kasni promotor (engl. *major late promoter*, MLP). pre-mRNA koja nastaje, alternativno se procesira te time nastaju pet kasnih mRNA, regije od L1 do

L5. Na krajevima virusne DNA nalaze se obrnuto ponavljajući sljedovi (engl. *inverted terminal repeats*, ITR) koji omogućavaju replikaciju viralne DNA.

Ovisno o tipu AdV, mogu nastati jedan ili dva nekodirajuća virus-povezana (eng. *virus-associated*, VA) transkripta, VA RNAI i VA RNAII. Transkripti su uključeni u regulaciju translacije, pri čemu se VA RNAI može ponašati kao microRNA (miRNA) (Lion, 2014; Curiel, 2016).

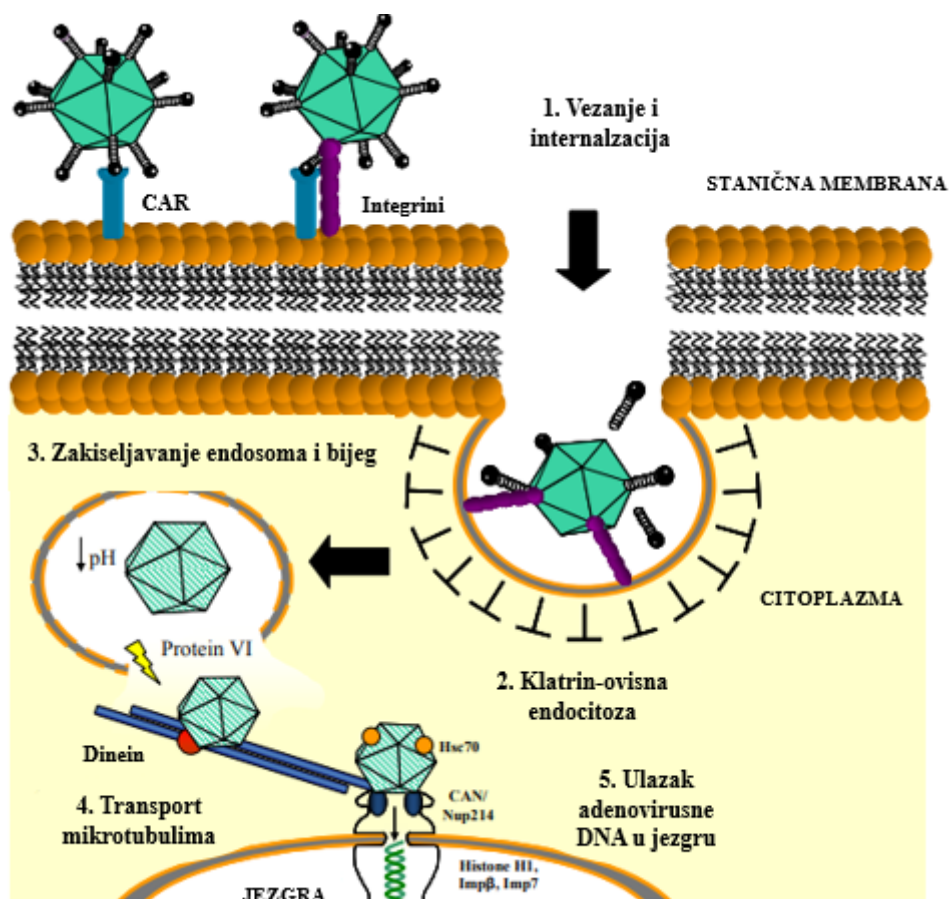


Slika 2. **Shematski prikaz organizacije adenovirusnog genoma** (preuzeto iz Vetrini i Ng, 2010).

### 2.3 VEZANJE I ULAZAK ADENOVIRUSA U STANICU

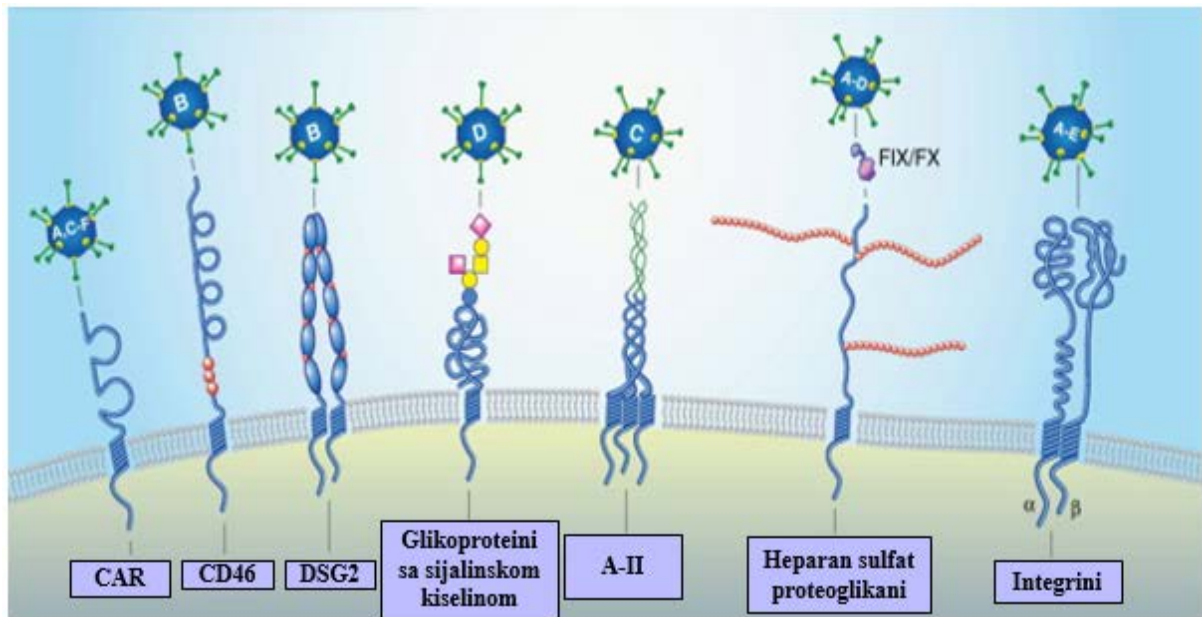
Ulazak adenovirusa u ciljnu stanicu odvija se u dva koraka: vezanje adenovirusne čestice na receptor/e nakon čega slijedi internalizacija odnosno endocitoza virusa u stanicu. Shematski prikaz ulaska adenovirusa u stanicu prikazan je na slici 3.





Slika 3. **Ulazak adenovirusa u stanicu domaćina.** Infekcija stanice adenovirusom uključuje vežanje na površinu stanice domaćina, ulazak u stanicu, izlazak iz endosoma, putovanje prema jezgri te ulazak adenovirusnog genoma u jezgru (preuzeto i prilagođeno iz Coughlan i sur., 2010).

Za vežanje adenovirusa na receptor odgovorno je vlakno, a molekule koje adenovirusi mogu koristiti kao receptore prikazane su na slici 4. Primarni receptor odgovoran za vežanje gotovo svih serotipova adenovirusa, osim serotipa B, je coxsackie adenovirus receptor (CAR). Adenovirusi grupe B mogu za vežanje koristiti membranski kofaktor CD46 ili desmoglein-2 (DSG2), dok su molekule koje za vežanje koriste adenovirusi grupe D slabije opisane i uključuju CAR, CD46 i sialičnu kiselinu (Arnberg, 2012).



Slika 4. **Shematski prikaz receptora koje koriste adenovirusi.** (Preuzeto i prilagođeno iz Arnberg, 2012). CAR, coxsackie and adenovirus receptor; CD46, membranski kofaktor, DSG2, desmoglein-2; FIX/FX, koagulacijski faktor IX i X, A-II "scavenger" receptor.

Većina adenovirusa ima RGD motiv u jednoj od dvije površinske petlje baze pentona. Nakon početnog vezanja na primarni receptor slijedi internalizacija adenovirusne čestice posredovana upravo vezanjem RGD slijeda iz baze pentona i  $\alpha v$  integrina na površini stanice (Arnberg, 2012). Interakcija adenovirusa s  $\alpha v$  integrinima potiče specifične signalne događaje koji su uključeni u ulazak adenovirusa u stanicu, kao što je na primjer aktivacija PI3K, FAK, p130CAS i Rho GTPaza. Ovi signalni događaji važni su za promjene u citoskeletu kao što su filopodijalni produžeci i stvaranje lamelipodija (Li i sur., 1998; Li i sur., 2001).

Za sam ulazak u stanicu adenovirus koristi endocitozu. Endocitoza je proces kojim stanica u sebe unosi tekućine, otopine, proteine povezane s membranom, kao i ligande koji se vežu na određeni receptor. Tim procesom se osigurava rast stanice, uključujući opskrbu nutrijentima, komunikaciju s okolišem te prijenos signala. Razlikujemo nekoliko tipova endocitoze: klatrinom posredovana endocitoza, makropinocitoza, fagocitoza, kaveolinom posredovana endocitoza, i CLIC/GEEC posredovana endocitoza (CLIC, klatrin-neovisan nositelj; GEEC, proteini obogaćeni glikosilfosfotidilinozitolom), IL-2 Arf6 posredovana endocitoza i flotilnom posredovana endocitoza. Adenovirus tipa 5 za ulazak u stanicu koristi klatrinom posredovanu endocitozu (Kalin, 2010), no pokazano je da u nekim

tipovima stanica ovaj virus može koristiti i ne-klatrinom posredovane putove kao što su lipidne domene unutar membrane.

#### **2.4. IZLAZAK ADENOVIRUSA IZ ENDOSOMA I PUTOVANJE DO JEZGRE**

Nakon što se endosom u kojem se nalazi adenovirus odvoji od plazmatske membrane stanice počinje aktivnost vakuolarne H<sup>+</sup>-ATPaze, što dovodi do zakiseljavanja unutrašnjosti endosoma do pH vrijednosti 5,5-6. Zakiseljavanje endosoma uzrokuje strukturne promjene u adenovirusnoj čestici na način da dolazi do oslobađanja proteina VI iz kapside adenovirusa koji uzrokuje pucanje membrane endosoma i izlazak kapside u citoplazmu (Perez, 1994).

Nakon izlaska iz endosoma kapsida adenovirusa se nalazi u viskoznom citosolu koji onemogućava jednostavnu difuziju pa za daljnji put prema jezgri stanice adenovirus koristi postojeću mrežu mikrotubula u citosolu (Greber, 1997). Vezanjem kapside uzduž mikrotubula dolazi do brzog premještanja kapside adenovirusa do jezgre stanice. Udaljenost koju adenovirus mora prijeći na taj način može biti jednaka i do 100 promjera kapside. U jednom trenutku kapsida adenovirusa mora se odvojiti od mikrotubula, međutim mehanizam razdvajanja još nije poznat.

Adenovirusna čestica putuje prema svom konačnom cilju, jezgri, u koju treba unijeti svoju DNA. Mehanizam ulaska adenovirusne DNA u jezgru stanice nije u potpunosti razjašnjen, no podaci iz literature spominju nekoliko proteina koji bi mogli biti uključeni: protein jezgrine pore CAN/Nup214, Hsc70 i CRM1 (Curiel, 2016).

#### **2.5. ADENOVIRUSI I POTICANJE IMUNOSNOG ODGOVORA NAKON INFEKCIJE**

Adenovirusi su vrlo imunogenični i infekcija adenovirusima potiče urođeni i stečeni imunوسي odgovor u stanicama sisavaca. Imunosni sustav domaćina odgovara na prisustvo adenovirusne kapside, adenovirusne DNA ili na samu infekciju, pri čemu je svo troje prepoznato kao molekularna oznaka povezana s patogenom (engl. *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs)) (Medzhitov i Janeway, 1997).

Urođeni imunوسي odgovor je prva linija obrane od patogena. Sastavljen je ne samo od fizičke barijere nego i od mreže različitih tipova stanica, uključujući dendritičke stanice, NK stanice, monocite/makrofage, stanice prirodne ubojice (NKT; engl. *natural killer T*

cells),  $\gamma\delta$  T stanice i neutrofile. Svaka stanica imunskog sustava eksprimira različite varijante receptora koji prepoznaju PAMP-ove, a koji se zovu receptori koji prepoznaju molekularne oznake ili PRR (engl. *pattern recognition receptors*). Ovi receptori mogu biti smješteni na površini stanice ili u citosolu. Urođeni imunski odgovor potaknut prepoznavanjem PAMP-a od strane staničnih PRR smještenih na površini stanice, na endosomu ili u citoplazmi dovodi do sinteze proupalnih citokina i kemokina, poput interferona (IFN) tipa I, interleukina (IL; IL-6, IL-12), ekspresije i sekrecije T stanica, makrofag-inflamatornih proteina-1 $\beta$ , IFN-gamma–induciranih proteina (IP)-10, i drugih.

Površinski PRR, poput Toll sličnih receptora (eng. *Toll-like receptors*, TLR; TLR1/2, TLR2/6, TLR4 i TLR5) i tipovi C lektina, prepoznaju izvanstanične PAMP-ove. Unutarstanični PRR, poput TLR3, TLR7 i TLR9, NOD slični receptor 9 (NLR9; engl. *NOD-like receptor 9*), prepoznaju unutarstanične PAMP-ove. Prepoznavanje specifičnih liganda rezultira aktivacijom određenih signalnih molekula poput MAP kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*), PI3K, nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), interferon regulatornih faktora (IRF) 3 i 7 i/ili AP-1 (Medzhitov i Janeway, 1997; Kumari sur., 2009). Adenovirusni PAMP može biti prepoznat od strane PRR u gotovo svim stadijima infekcije adenovirusom od vezanja na receptor i endocitoze do unutarstaničnog putovanja. Infekcija adenovirusom potiče imunski odgovor čime se sintetiziraju brojni kemokini, MIP1, RANTES, IL-8, interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ) kao i citokini, faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-1, IL-12, IFN1, koji moduliraju upalu. Osim toga, imunski odgovor na adenovirus može biti potaknut i kao posljedica interakcije sa staničnim receptorima. Tako npr. vezanje na CAR okida ERK 1/2, JNK, MAPK i NF- $\kappa$ B posredovane signalne putove, što dalje rezultira povećanjem IL-8, GRO- $\alpha$ , GRO- $\gamma$  ili RANTES, dok RGD motiv u bazi pentona aktivira NF- $\kappa$ B, koji potiče reakciju upale (Bruder i Kovesdi, 1997).

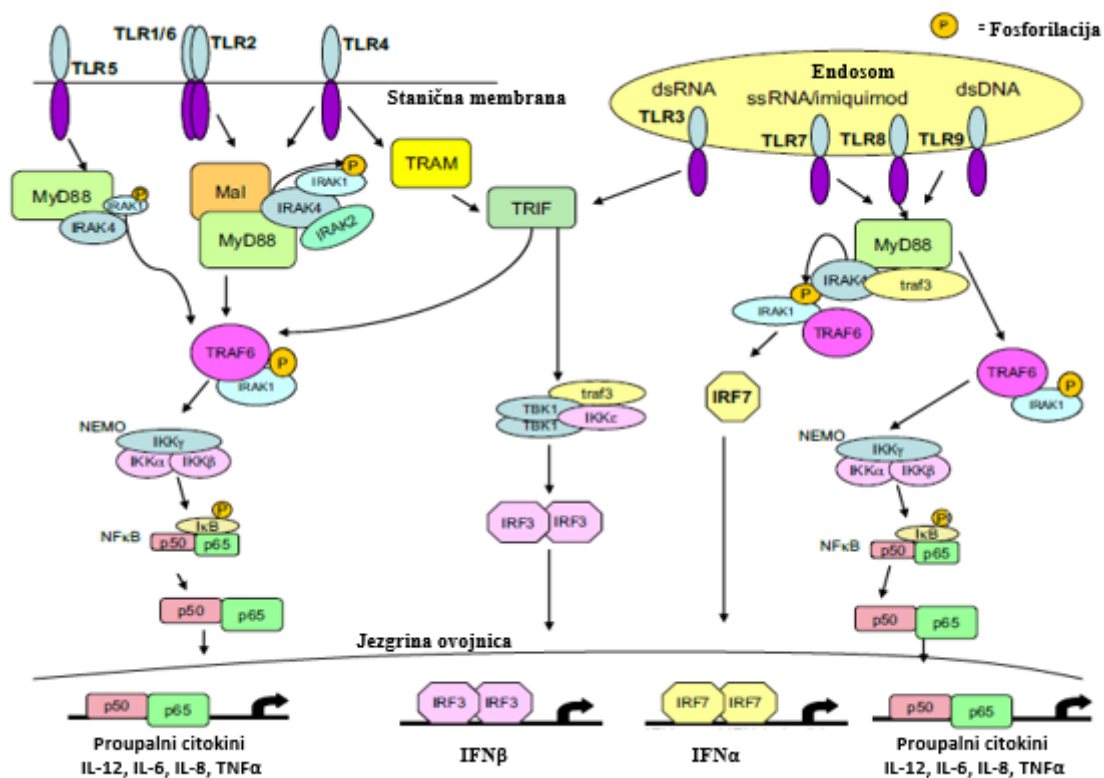
Proizvodnja proupalnih citokina i kemokina te interferona tipa I pojavljuje se 1-6 sati nakon infekcije adenovirusom, uključujući ekspresiju IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL12, KC, RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , i IP-10 (Hartman i sur., 2007). Urođeni imunski odgovor dovodi do sinteze proupalnih citokina i kemokina, poput IFN tipa I, IL-6, IL-12, IFN-gamma–induciranih proteina (IP)-10, i drugih. (Kawai i Akira, 2010).

Izlazak adenovirusa iz endosoma povezan je sa aktivnošću protein kinaze C, proteina 38 (p38) i ERK (engl. *extracellular signal regulated kinases*) koji spadaju u porodicu MAP kinaza. Aktivacija p38 i ERK MAP kinaza te NF- $\kappa$ B odgovorna je za indukciju kemokina,

poput IP-10 i IL-8, koji su proučavani kod infekcija respiratornih epitelnih stanica adenovirusima serotipa B (Fejer i sur., 2011). U epitelnim staničnim linijama, poput A549 (stanice adenokarcinoma pluća čovjeka), adenovirusi induciraju ekspresiju različitih adhezijskih molekula leukocita.

Aktivacija p38, ERK, ali ne i JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) se događa nekoliko minuta nakon što adenoviralni vektor uđe u stanicu. Prijenos signala pomoću p38 igra veliku ulogu u indukciji IP-10 u usporedbi sa ERK, no ukoliko se blokiraju oba puta, pokazano je sinergističko djelovanje. Rana aktivacija signalnih putova i posljedično, ekspresija kemokina, upućuje da je reakcija na ulazak virusa u stanicu rani događaj (Liu i Muruve, 2003). Adenovirusi potiču transkripciju IP-10, posredovanu NF- $\kappa$ B što se događa u odsutnost TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . NF- $\kappa$ B je potreban za transkripciju mRNA IP-10, dok I $\kappa$ B suprimira sintezu IP-10 (Borgland i sur., 2010, Zsengelle'r i sur., 2000).

Unutarstanični TLR, redom TLR3, TLR7, TLR8, i TLR9, mogu prepoznati nukleinske kiseline. Aktivacija urođenog imunskog odgovora na adenoviruse može biti posredovana TLR-ovisnim mehanizmima, kao i TLR-neovisnim mehanizmima (Curiel, 2016; Appledorn i sur., 2008). Pokazano je da dvolančani adenovirusni genom može biti prepoznat pomoću TLR9 smještenog u membrani endosoma (Kawai i Akira, 2010). Osim toga, TLR9 prepoznaje nemetilirane CpG otoke ssDNA prisutne u bakterijama i virusima pri čemu može doći do indukcije sinteze proupalnih citokina i kemokina (Kumar, 2009). Kaskada reakcija potaknuta TLR9 ovisna je o MyD88 proteinu, uzrokuje aktivaciju MAP kinaza te posljedično translokaciju NF- $\kappa$ B u jezgru stanice. Kao rezultat, dolazi do sinteze IL-6, pro-IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , a aktivacija MyD88 puta može dovesti i do indukcije IFN tipa I (Hensley i Amalfitano, 2007; Kawai i Akira, 2010). Shema mogućih signalnih puteva potaknutih infekcijom patogena prikazana je na slici 5.

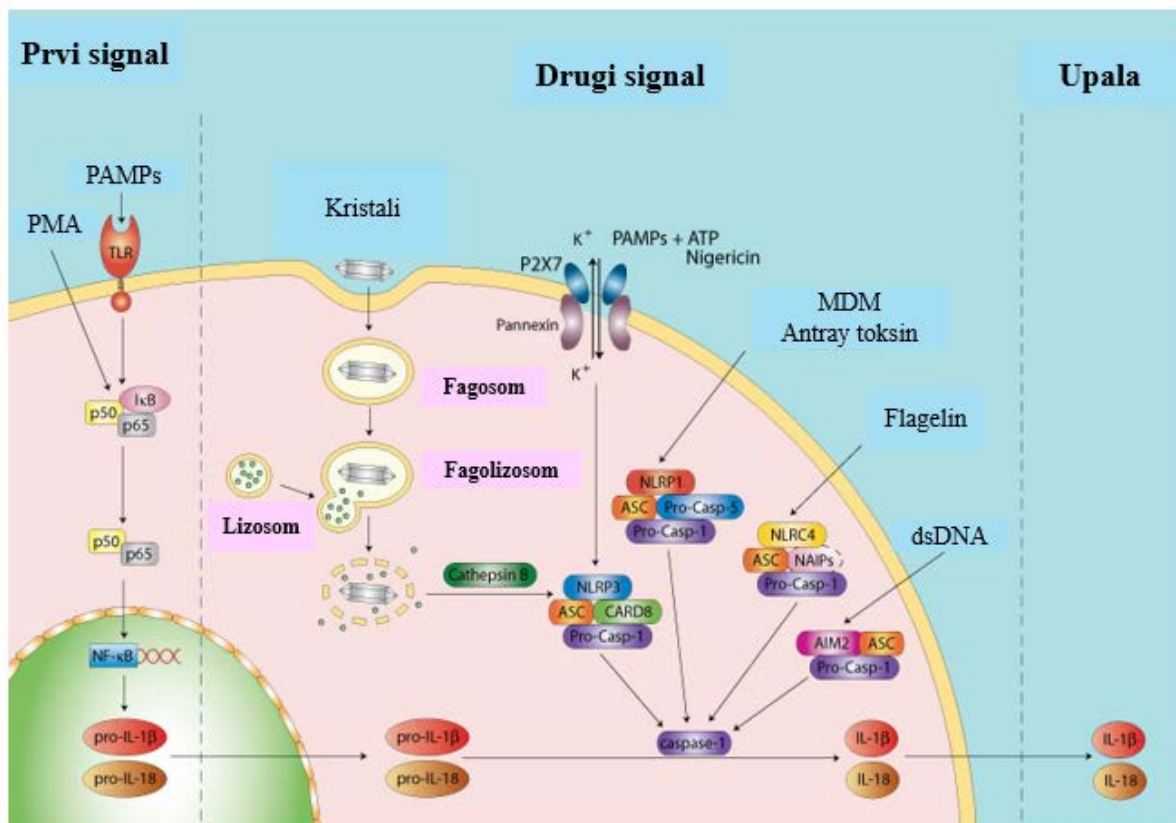


Slika 5. Signalni putevi potaknuti vezanjem patogena na TLR (preuzeto i prilagođeno iz Zhao, 2011).

Također, pokazano je da je proizvodnja određenih proupalnih citokina i kemokina ovisna o MyD88, no ne i TLR9 putu, što znači da adenovirusi potiču nekoliko signalnih puteva, neovisnih o prepoznavanju DNA od strane TLR9 receptora.

Postoje podaci da citosolni senzori za adenovirusnu DNA mogu aktivirati i inflamason (Slika 6.). Inflamason je multiproteinski kompleks, koji omogućava aktivaciju kaspaze-1 te sazrijevanje i lučenje IL-1 $\beta$ . Aktivacija inflamasona potaknuta bijegom adenovirusa iz endosoma dovodi do indukcije sekrecije IL-1 $\beta$ . Alternativnim mehanizmom dolazi do otpuštanja katepsina B iz fagolizosoma tijekom bijega adenovirusa te do aktivacije kaspaze-1 i NLRP3, što za posljedicu ima sintezu citokina (Kumar i sur., 2009).

Indukcija IFN- $\alpha\beta$  potaknuta viralnom DNA zahtijeva IRF3, no ne i aktivaciju MAP kinaza. No adenovirusom potaknut nastanak IFN tipa I strogo zahtijeva aktivaciju IRF7, koji je medijator prilikom bijega iz endosoma, ali ne nužno i aktivaciju IRF3, JNK MAP kinazu i TBK1 (Fejer i sur., 2011).



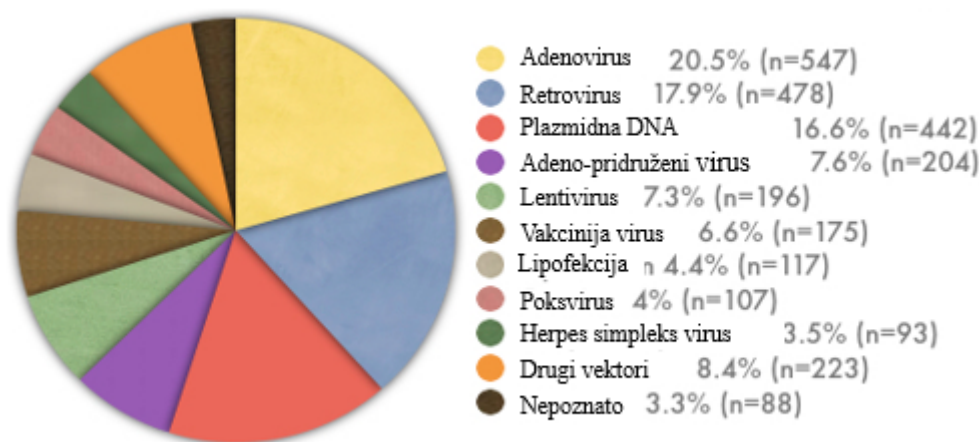
Slika 6. Aktivacija inflammasoma potaknuta citosolnim sensorima (preuzeto i prilagođeno iz <https://ysshassanblog.wordpress.com/2013/01/06/inflammasomes/>).

## 2.6. ADENOVIRALNI VEKTORI

Zahvaljujući velikom znanju molekularne biologije adenovirusa kao i razvoju metoda za manipulaciju virusnog genoma, adenovirusi su postali primamljivi kandidati za razvoj vektora namijenjenih prijenosu gena, vakcinaciju ili onkolitičkoj terapiji. Adenoviralni vektori se danas koriste u više od 20% kliničkih ispitivanja genske terapije što ih čini prvim izborom u ovom pristupu liječenja (Slika 7.). Adenoviralni vektori najčešće se koriste za prijenos gena u kliničkim pokusima genske terapije tumora i infekcija (za razvoj vakcina) te u neurološkim i metaboličkim bolestima.

Da bi se oslobodio prostor za ugradnju strane DNA različiti dijelovi adenovirusnog genoma mogu biti uklonjeni što rezultira nastankom vektora za prijenos gena. Kako bi se dobili replikativno defektni vektori, potrebno je ukloniti E1A regiju viralnog genoma odgovornu za aktivaciju replikacije adenovirusa. Osim što će time biti onemogućena ekspresija ranih i kasnih viralnih gena pa time i replikacija, povećat će se i kapacitet za ugradnju transgena. Budući da E3 regija virusnog genoma nije esencijalna, također se

uklanja prilikom konstruiranja viralnih vektora, čime se dodatno povećava kapacitet za ugradnju transgena i omogućuje ugradnja gena do veličine 8.2 kb.



Slika 7. **Vektori korišteni u kliničkim ispitivanjima u genskoj terapiji** (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>).

Prednosti korištenja adenoviralnih vektora su nastanak visoko stabilnih čestica koje mogu efikasno unijeti strani genetički materijal u stanice koje se dijele, kao i u mirujuće stanice, veliki kapacitet ugradnje strane DNA, jednostavnost prilikom genetičke manipulacije. Nadalje, moguće ih je proizvesti u velikoj količini, ne ugrađuju se u genom domaćina pa ne predstavljaju opasnost za insercionu mutagenezu. S druge strane, uspješna primjena adenoviralnih vektora u kliničkom liječenju nailazi na probleme kompleksnih interakcija stanice domaćina i vektora. S obzirom da je svatko od nas u jednom trenutku života bio inficiran adenovirusom, većina populacije posjeduje imunološki odgovor prema uobičajenim serotipovima adenovirusa poput adenovirusa tipa 2 ili 5 pa je prevalencija neutralizacijskih protutijela prema uobičajenim serotipovima adenovirusa u ljudi visoka. Neutralizacijska protutijela se proizvode prema proteinima heksona i vlakna, no odgovor na heksonu je dominantan (Curiel, 2016). Protutijela specifična za vektor mogu onemogućiti ekspresiju transgena unesenog vektorom te je pronalazak strategije koja bi umanjila utjecaj neutralizacijskih protutijela od velikog interesa. Jedan od trenutno istraživanih pristupa je konstrukcija vektora na osnovi neučestalih serotipova adenovirusa čovjeka (AdV4, AdV7, AdV9, AdV11, AdV26, AdV35, AdV48, i AdV50) odnosno adenovirusa čimpanze (ChAdV3 i ChAdV63). Takvi alternativni adenovirusni serotipovi se koriste kako bi se poboljšala i produljila ekspresija transgena u individuama u kojima



postoji jaka imunosna reakcija, od strane neutralizacijskih antitijela, kao i od strane CD8+ T-limfocita, prema najčešće korištenim adenoviralnim vektorima temeljenima na učestalim serotipovima adenovirusa. Jedan od obećavajućih kandidata za razvoj novih vektorskih vakcina je adenovirus tipa 26 (AdV26) (Liu i Muruve, 2003). Istraživanjima je pokazano da je u novorođenčadi niska seroprevalencija za AdV26 i AdV35, a djeca su imala visoku razinu neutralizacijskih protutijela na AdV5 i AdV26, iako je titar AdV26 bio niži u usporedbi s AdV5 (Curiel, 2016). Također, istraživanja su pokazala da je kod geografsko različitih populacija, rizičnih grupa te ljudi različite dobi titar neutralizacijskih protutijela na AdV26 znatno niži u odnosu na AdV5 (Barouch i sur., 2011).

### 2.6.1. Adenovirus tipa 26

Do sada najbolje istražen adenovirus je adenovirus tipa 5 te su vektori bazirani na adenovirusu tipa 5 najčešće korišteni. Ograničenja AdV5, prvenstveno prisutnost neutralizacijskih protutijela, dovela su do potrebe istraživanja drugih serotipova adenovirusa kao platformi za razvoj novih vektora. Jedan od obećavajućih adenovirusa je AdV26 koji se bitno razlikuju od AdV5 i to po pitanju seroepidemiologije, *in vivo* tropizma i profila urođenog imunosnog odgovora (Li i sur., 2012). Adenovirus tipa 26 pripada u podgrupu D adenovirusa. Koristi se kao vektor u svrhu vakcinacije i to najprije zbog niske seroprevalencije odnosno zaobilazanja postojećeg protu-vektorskog imunosnog odgovora u stanici domaćinu. Iako neutralizacijska protutijela na AdV26 mogu biti značajna kod nekih ljudi, titar AdV26 je niži u odnosu na titar neutralizacijskih protutijela AdV5 (Barouch i sur., 2011). U usporedbi s AdV5, AdV26 potiče značajno višu razinu antiviralnih i proupalnih citokina i kemokina u serumu vakciniranih majmuna, kao i u mononuklearnim stanicama periferne krvi čovjeka (PBMC, engl. *human peripheral blood mononuclear cells*). Detektirani antiviralni i proupalni kemokini i citokini su uključivali IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IP-10, IL-6 i IL-1RA. Na temelju navedenih spoznaja nije poznat ukupan mehanizam urođenog imunosnog odgovora potaknutog različitim serotipovima adenovirusa no jedan od razloga razlike bi moglo biti različito putovanje adenoviralnih vektora do kasnog endosoma. S obzirom da AdV5 i AdV26 za ulazak u stanicu koriste različite receptore može se pretpostaviti da im se i unutarstanično putovanje razlikuje. Signalni putovi uključeni u poticanje urođenog imunosnog odgovora aktivirani u kasnom endosomu ovise o zakiseljavanju. AdV26 se akumulira u kasnom endosomu znatno više od AdV5, a AdV5 puno brže putuje do jezgre (Teigler i sur., 2014). U stanicama periferne

krvi, poput monocita, AdV26 koristi CD46 kao primarni receptor za vezanje na stanicu (Li i sur., 2012; Teigler i sur., 2012) te je istraživanjima pokazano da je za prijenos AdV26 do kasnog endosoma dovoljno vezanje virusa samo na molekulu CD46 koja se nalazi na površini stanice (Teigler i sur., 2014). Receptor koji AdV26 koristi za infekciju epitelne stanice nije poznat.

Rekombinantni AdV26 vektori mogu se uzgajati do visokog titra u staničnim linijama koje komplementiraju E1 regiju AdV5 te posjeduju nekoliko povoljnih karakteristika koje omogućavaju primjenu u razvoju vektorskih vakcina (Geisbert i sur., 2011; Abbink i sur., 2007). AdV26 se istražuje kao vektor u vakcinaciji protiv HIV-1, Ebole i drugih patogena (Teigler i sur., 2012; Li i sur., 2012). Nekoliko kliničkih pokusa koji istražuju AdV26 kao vektor za vakcinaciju protiv Ebole trenutno je u fazi III ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Osnovne kemikalije

Tablica 2. Popis kemikalija korištenih u ovom radu

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
Agaroz	Sigma-Aldrich, Njemačka
Akrilamid smjesa 30%	Serva, Njemačka
Amonijev persulfat, APS 10% ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Serva, Njemačka
Bisakrilamid (C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Serva, Njemačka
Bromfenol-plavo (engl. <i>Bromphenol blue</i> )	Sigma-Aldrich, SAD
Dimetil sulfoksid, DMSO (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Gram Mol, Hrvatska
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , DMEM)	Lonza, Švicarska
Etidij-bromid (EtBr)	Serva, Njemačka
Fiksir	Fotokemika, Hrvatska
Goveđi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumine</i> , BSA)	Macherey-Nagel, Njemačka
G 418 Sulfate	Calbiochem, SAD
IsoFlow tekućina (engl. <i>IsoFlow Sheath Fluid</i> )	Beckman Coulter Inc., SAD
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen, SAD
Natrij-dodecil sulfat, SDS (NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Optimem	Gibco, SAD
Orange G boja	Merck, Njemačka
PFA 4%	Sigma, Njemačka
Power sybr® green, PCR Master Mix	Applied biosystem, UK
Proteinski marker (engl. <i>Protein Marker</i> , PM)	Thermo Scientific, SAD
Razvijač	Fotokemika, Hrvatska
Serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Invitrogen, SAD
Standard za elektroforezu	Thermo Scientific, SAD
Tween-20® (C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )	Sigma-Aldrich, SAD

Tris ( $C_4H_{11}NO_3$ )	Sigma, Njemačka
Tris-klorovodična kiselina, Tris-HCl	Merck, SAD
Virocid 1%	Genera, Hrvatska
<i>Western Lightning<sup>®</sup> Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus</i>	PerkinElmer <sup>®</sup> , SAD
<i>Western Lightning<sup>®</sup> Plus ECL Oxidizing Reagent Plus</i>	PerkinElmer <sup>®</sup> , SAD
N, N, N', N'-tetrametiletilenediamin, TEMED ( $C_6H_{16}N_2$ )	Sigma-Aldrich, SAD
2-merkaptetoetanol ( $C_2H_6OS$ )	Serva, Njemačka

### 3.1.2. Pufferi i otopine

Tablica 3. Priprema puffera i otopine

<b>PUFER/OTOPINA</b>	<b>PRIPREMA</b>
Amidocрно boja 0,1%	45 mL metanola, 10 mL octene kiseline, 45 mL vode, 0,1 g amido black otopine u 100 mL
Otopina CsCl gustoće 1,25 g/mL	36,16 g CsCl otopi se u 100 mL TD puffera
Otopina CsCl gustoće 1,34 g/mL	51,20 g CsCl otopi se u 100 mL TD puffera
Otopina CsCl gustoće 1,40 g/mL	62,00 g CsCl otopi se u 100 mL TD puffera
Otopina za odbojavanje	40 mL metanola, 7 mL octene kiseline, 53 mL vode
Pufer TAE (50x)	242 g Tris baza, 57,1 mL ledene octene kiseline, 100 mL 0,5 M, pH 8.0, otopiti u 1 L diH <sub>2</sub> O
Pufer za nanošenje uzoraka DNA u gel agaroze (6x)	50% glicerol, 20 mM EDTA, 0,25% Orange G boja
Pufer TD	8 g NaCl i 0,38 g KCl otopi se u 150 mL diH <sub>2</sub> O, doda se 0,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH <sub>2</sub> O, podesi pH 7.4-7.5, nadopuni do 1 L s diH <sub>2</sub> O; sterilizira se autoklaviranjem
Sterilni fosfatni pufer (PBS)	2 g 2,7 mM KCl; 0,2 g 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,0 g 137 mM NaCl; 1,15 g 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> u 1000 ml deH <sub>2</sub> O
TBS pufer	0,6 g 10 mM Tris; 4,38 g 150 mM NaCl u 500 ml biH <sub>2</sub> O
Transfer pufer	50 ml Tris-glicinski pufer pH 8,3; 350 ml biH <sub>2</sub> O; 100 ml etanol
1x Tris-glicinskom pufer	10x pufer: 24 g Tris; 114 g glicin; 10 g SDS u 1 L biH <sub>2</sub> O
6x koncentrirani pufer za uzorke	2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g SDS; 3 ml glicerol; 20 mg bromfenol-plavo; 1,2 ml 2-merkaptetoetanol u 10 ml biH <sub>2</sub> O

### 3.1.3. Stanične linije

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

### 3.1.4. Replikativno defektni adenovirusi

U ovom radu korišteni su replikacijski defektni adenovirusi AdV26 s transgenom eGFP pod CMV promotorom. Korišteni vektori prethodno su konstruirani i opisani (Abbink i sur., 2007).

### 3.1.5. Početnice

Tablica 4. Početnice korištene u metodi lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (Real Time RT-PCR)

<b>GEN</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
IL-6	5' – CAATGAGGAGACTTGCCTGG	5' - GCACAGCTCTGGCTTGTTC
IL-8	5'- GTTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTC	5' - ATGAAGTGTGAAGTAGATTGCTTG
IL-18	5' – GACTGTAGAGATAATGCAC	5' – CTTCGTTTTGAACAGTGAAC
IFN- $\alpha$ 1	5' – AAACAGATGAAGTGCTCCTTCC	5' – AAGATGAAGGGAAAGAAGGTGC
IL-1 $\beta$	5' – ACCCACAGCCTGGATAACAG	5' – CTCTCCTCCTGCATCACACA
IFN $\beta$	5' – GTCTCCTCCAAATTGCTCTC	5' – ACAGGAGCTTCTGACACTGA
MyD88	5' – TGCAGAGCAAGGAATGTGAC	5' - AGGATGCTGGGGAACCTTT

### 3.1.6. Ostali materijali

Za pročišćavanje virusa centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu CsCl korištene su epruvete za centrifugiranje Ultra-Clear 344059 (Beckman, SAD).

Za ukljanjanje CsCl nakon pročišćavanja virusa centrifugiranjem u gradijentu CsCl korištena je kolona Sephadex G25M (GE Healthcare Life Sciences, Velika Britanija).

Za izolaciju ukupne RNA iz kulture stanica korišten je High Pure RNA Isolation Kit, (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), REF: 11828665001, LOT: 23660300.

Za obrnuto prepisivanje ukupne RNA korišten je High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, Litva), REF: 4368814, LOT: 00523354.

Za određivanje specifičnih antigena ELISA testom korišten je Support Pack Standard, Basuc reagents kit for Module Sets (Invitrogen, Austrija), REF: BMS412, LOT: 154055000.

### 3.1.7. Uređaji i pomagala

Tablica 5. Korišteni uređaji i pomagala

NAZIV	PROIZVOĐAČ
Bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75	Falcon Becton Dickinson, SAD
Brojač stanica	Beckman Coulter, Ujedinjeno Kraljevstvo
Centrifuga do 50 mL	Heraeus, Njemačka
Centrifuga MSE Harrier 18/80	Camlab, UK
ELISA pločica	Greiner Bio-One, Njemačka
Epruvete Ultra-Clear 344059	Beckman, SAD
Fotografski film	GE Healthcare Limited, UK
Gumena strugalica	Falcon Becton Dickinson, SAD
Hamilton igla	Hamilton, Švicarska
Igla za pročišćavanje virusa	Merck, Švicarska
Inkubator za stanica	Thermo Scientific, SAD
Invertni svjetlosni mikroskop	Opton, Njemačka
Izvor napona za gel elektroforezu	Pharmacia LKB, Njemačka
Kabinet za sterilan rad	Klimaoprema, Hrvatska
Kolona Sephadex G25M	GE Healthcare Life Sciences, Velika Britanija
Mikroepruvete	Eppendorf, Njemačka
Mikrovalna pečnica	Končar, Hrvatska
Nanodrop	Thermo Scientific, SAD
Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 $\mu\text{m}$	Sigma-Aldrich, Njemačka
PCR pločica	Applied biosystem, Kina
PCR uređaj	Eppendorf, Njemačka
Petrijeva posuda	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj stanica sa 6 i 12 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD

Protočni citometar	FACSCalibur, Beckton Dickinson, SAD
Rotamix 560 MMH, magnetska mješalica	Tehtnica, Slovenija
RT-PCR uređaj	Applied biosystem, Singapur
Spektrofotometar – ELISA	Mibex, Hrvatska
Uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom	Cole Palmer, SAD
Stolna centrifuga	Eppendorf, Njemačka
Sustav za horizontalnu elektroforezu	Bio-Rad, SAD
Termoblok	Eppendorf, Njemačka
Transiluminator	Vilber Lourmat, Njemačka
Tresilica	Tehtnica, Slovenija
Ultracentrifuga	Beckman, SAD
Uvitec	Alliance, UK
Vaga	Tehtnica, Slovenija
Vodena kupelj	Tehtnica, Slovenija
Vorteks	Tehtnica, Slovenija



### 3.1.8. Protutijela

Tablica 6. Popis korištenih protutijela

<b>PROTUTIJELO</b>	<b>SPECIFIČNOST</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>	<b>KATALOŠKI BROJ</b>
Primarna Protutijela	Kaspaza-1	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-56036, Lot # I1013
	IKB- $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-1643, Lot # D0517
	P-ERK (E-4)	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7383, Lot # L140
	ERK-1 (K-23)	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-94, Lot # F1615
	P-p38 (D-8)	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7973, Lot # K100
	p38 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-535, Lot # K150
	TLR9	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-52966, Lot # C1317
Sekundarna Protutijela	Tubulin	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-5286, Lot # K1912
	Anti-mišje IgG	GE Healthcare Life Sciences	NA931V, Lot #
	ECL™ HRP	(SAD)	9799907
	Anti-zečje IgG- HRP	Santa Cruz Biotechnology (SAD)	sc-2370, Lot # B0445

### 3.1.9. siRNA i shRNA molekule

U ovom radu je korištena siTLR (Ambion, Njemačka) u svrhu utišavanja TLR9 receptora, Cat # 4392421, Lot # AS028BBM.

Za transfekciju i izdvajanje stabilno transficiranih staničnih linija korištene su sh(TLR9) i sh(-)dobiveni od dr. sc. Johanna Tuomela, Turku, Finska.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice korištene u ovom radu uzgajane su *in vitro* u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm u inkubatoru za uzgoj stanične kulture u kojem se održavaju stalna temperatura zraka pri 37°C, udio  $CO_2$  na 5% u smjesi zraka te je atmosfera zasićena vlagom. Stanice rastu u hranjivoj podlozi DMEM-FBS koja sadrži DMEM (Dulbeccova modifikacija Eagleove hranjive podloge, engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) uz dodatak 10% seruma fetusa goveda (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS). Stanice korištene u ovom radu su adherentne što znači da rastu pričvršćene za dno Petrijeve zdjelice sve dok ne prerastu površinu za rast, iscrpe sastojke hranjive podloge ili prestanu rasti zbog nakupljanja toksičnih metabolita.

### 3.2.2. Odmrzavanje stanica

Stanice se čuvaju zamrznute u ampulama u spremniku s tekućim dušikom. Odmrzavaju se uranjanjem u vodenu kupelj zagrijanu do 37°C nakon čega se resuspendiraju u finalno 10 mL DMEM-FBS hranjive podloge i prebace u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm. Petrijeva zdjelica se pohrani u inkubatoru za uzgoj kulture stanica.

### 3.2.3. Održavanje stanica

Kad stanice prerastu površinu za rast ili iscrpe sastojke hranjive podloge potrebno ih je presaditi u novu Petrijevu zdjelicu. Uklanja se hranjiva podloga sa stanica i stanice se ispiru dva puta s po 1 mL prethodno zagrijanog PBS pufera (37°C), nakon čega se dodaje 1 mL tripsina da se stanice odvoje od podloge za rast. Kad se stanice odvoje od podloge, dodaje se 9 mL DMEM-FBS hranjive podloge (zagrijane na 37°C) da bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Stanice se raspodijele na željeni broj Petrijevih zdjelica promjera 10 cm u koje se zatim doda DMEM-FBS hranjiva podloga do ukupnog volumena od 10 mL.

### 3.2.4. Zamrzavanje stanica

Stanice se odvoje od podloge pomoću tripsina i resuspendiraju u DMEM-FBS hranjivoj podlozi kao što je opisano u odljeku 3. Suspenzija stanica se prebaci u plastičnu epruvetu i centrifugira 10 min pri 1100 x g. Talog stanica se resuspendira u 950 µL DMEM-FBS hranjive podloge i 50 µL DMSO-a (5% volumnog udjela) te se stanice prebace u ampulu

za smrzavanje. Ampula se stavlja prvo na led i nakon 30 min se prebaci na prsten spremnika s tekućim dušikom (smrzavanje u parama tekućeg dušika). Sljedeći dan se ampule stavljaju u spremnik s tekućim dušikom.

### 3.2.5. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa centrifugiranjem u cezijevoj kloridu

Za umnažanje replikacijski defektnih adenovirusa koriste se HEK-293 stanice koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma. Za svaku preparaciju virusa HEK-293 stanice su namnožene u 120 Petrijevih zdjelica promjera 10 cm i inficirane suspenzijom virusa tako da je multiplicitet infekcije 5-10 BFU (engl. *blue forming unit*) po stanici. Inficirane stanice se stavljaju u inkubator za uzgoj stanica do postignuća potpunog citopatogenog učinka (najčešće 48 do 72 sata nakon infekcije). Stanice se odvajaju od podloge pipetiranjem te se skupe u epruvetu i centrifugiraju tijekom 10 min pri 1100 x g. Ukupni talog stanica se resuspendira u 10 mL podloge DMEM-FBS i nakon toga se tri puta smrzava (-20°C) i odmrzava (37°C) da se virusi oslobode iz stanica. Centrifugiranjem tijekom 10 min pri 3600 x g odvajaju se grubi raspadnuti ostaci stanica (talog) i oslobođene virusne čestice (supernatant). Adenovirusi iz supernatanta se dalje pročišćavaju u dva koraka: prvo na jastučiću CsCl, a potom u gradijentu CsCl. Pročišćavanje na jastučiću CsCl započinje tako da se u epruvetu za centrifugiranje dodaje 2,4 mL CsCl gustoće 1,4 g/mL i na njega nježno uz stijenku nadsloji 2,4 mL CsCl gustoće 1,25 g/mL pazeći da ne dođe do miješanja slojeva. Nadalje se u epruvetu za centrifugiranje dodaje supernatant lizata stanica s oslobođenim virusnim česticama i potom se do vrha epruvete dodaje DMEM-FBS hranjiva pologa. Uzorci se centrifugiraju u Beckman ultracentrifugi u rotoru SW41Ti tijekom 1 sat i 45 minuta pri 20°C i 60 000 x g. Nakon centrifugiranja vidljiv je sloj virusa kao bijela zona na granici između dva sloja CsCl i iznad tog sloja druga zona s nepotpunim virusnim česticama (npr. prazna kapsida). Sloj virusa se pažljivo pomoću šprice s iglom pokupi u što manjem volumenu (idealno do 1,5 mL) i pomiješa u novoj epruveti za centrifugiranje s CsCl gustoće 1,34 g/mL do vrha epruvete za centrifugiranje. Uzorci se centrifugiraju u Beckman centrifugi u rotoru SW41Ti preko noći (okvirno 16-20 sati) pri 20°C i 60 000 x g. Tijekom centrifugiranja stvara se gradijent gustoće CsCl i virusi se zaustavljaju u području koje je jednake gustoće kao i gustoća virusa. Virusi se pomoću šprice s iglom skupljaju u novu epruvetu nakon čega se CsCl uklanja tehnikom gel-filtracije pomoću kolone Sephadex G-25M (Amersham Pharmacia Biotech, Velika Britanija). Kolona se pričvrsti za stalak, vrh joj se odreže

škarama i potom se odčepi s gornje strane kako bi tekućina sama iscurila iz kolone. Potom se kolona 6 puta ispiru s po 5 mL pufera PBS nakon čega se na kolonu dodaje pročišćeni virus (ne više od 1 mL) i u mikroeprovetu se skupi eluat (frakcija 0). Nadalje se dodaje po 0,5 mL pufera PBS na kolonu, pritom skupljajući frakcije u brojem obilježene mikroeprove. Frakcije u kojima se nalazi virus se skupe te im se dodaje glicerol tako da mu konačan volumni udio bude 10%. Suspenzija virusa se razdijeli u alikvote i smrzava pri -80°C.

### 3.2.6. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Za određivanje koncentracije virusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa koristi se metoda Mitteredera i sur. (1996). Pripremi se 10x razrjeđenje pročišćenih virusa u PBS puferu i 0,1 % natrij dodecilsulfata (SDS) te inkubira 10 min pri 56°C da bi se oslobodila virusna DNA iz kapsida. Mikroeprove s uzorcima se kratko centrifugiraju (30 s) pri 10000 x g i tada se mjeri apsorbancija otopine pri 260 nm prema puferu koji je korišten za razrjeđivanje virusa.

Koncentracija virusnih čestica se računa prema formuli:

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

N – broj virusnih čestica u mL

A<sub>260</sub> – izmjerena apsorbancija pri 260 nm

r – razrjeđenje suspenzije adenovirusa

### 3.2.7. siRNA posredovano utišavanje TLR9 receptora u A549 staničnoj liniji

Male interferirajuće molekule RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) su dvolančane RNA molekule duljine 20-25 nukleotida koje su, između ostalog, uključene u RNA interferenciju odnosno u utišavanje ekspresije specifičnog gena. siRNA induciraju degradaciju komplementarne mRNA i na taj način utišavaju ekspresiju proteina. Utišavanje proteina se postiže transfekcijom malih interferirajućih RNA uz pomoć liposoma i to komercijalno dostupnim reagensom Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen). Za utišavanje TLR9 receptora koristila se komercijalno dostupna siRNA specifična za TLR9 receptor.

Prvi dan stanice se nasade u pločicu s 6 bunarića. Gustoća stanica mora biti između  $2 \times 10^5$  –  $5 \times 10^5$  stanica po bunariću te se koristi hranjiva podloga bez antibiotika. Drugi dan se pripremi kompleks siRNA i reagensa Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX. Za transfekciju svakog pojedinog bunarića pripremljene su po dvije otopine: otopina A i otopina B, svaka u konačnom volumenu od 250  $\mu$ L. Otopina A sadrži siRNA razrijeđenu u OptiMEM®-u na način da je koncentracija siRNA (TLR9) u konačnom volumenu nakon dodavanja na stanice 100 nM. Otopina B sadrži 3  $\mu$ L reagensa Lipofectamine® RNAiMAX razrijeđenog u OptiMEM®-u.

Otopine A i B se pomiješaju, te se smjesa ostavi na sobnoj temperaturi 10 minuta. Ovako pripremljena smjesa nakapa se na stanice koje su nakon transfekcije ostavljene rasti 72 sata u inkubatoru za uzgoj kulture stanica u već opisanim standardnim uvjetima. Uspješnost utišavanja provjerena je određivanjem ekspresije proteina western analizom.

### 3.2.8. Određivanje uspješnost transdukcije adenovirusom

Uspješnost transdukcije AdV26 određena je na stanicama A549 i to sa i bez utišavanja TLR9 receptora. U pločicu s 12 bunarića se nasadi  $10^4$  stanica po bunariću koje su nakon utišavanja proteina TLR9 korištenjem specifične siRNA inficirane s AdV26. Broj virusa po stanici, MOI (engl. *multiplicity of infection*), iznosi  $5 \times 10^4$  virusnih čestica po stanici. Nakon 48 sati inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, uspješnost transdukcije određuje se protočnim citometrom. AdV26 korišten u ovom radu kao gen dojavljiivač ima ugrađen gen koji kodira zeleni fluorescentni protein na osnovu čije ekspresije se protočnom citometrijom može odrediti postotak transduciranih stanica. Ukratko, 48 sati nakon infekcije, hranjiva podloga se ukloni te se stanice ispiru sa 300  $\mu$ L PBS pufera, a nakon toga tripsiniziraju sa 300  $\mu$ L tripsina. Nakon što se stanice odvoje od podloge, dodaje se 1,5 mL PBS pufera te se uzorak centrifugiran 10 minuta na 1100 x g. Nakon centrifugiranja, PBS se uklanja te se dodaje 100  $\mu$ L 1% otopine paraformaldehida (PFA), kako bi se stanice fiksirale. Stanice se inkubiraju u 1% PFA tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom se paraformaldehid ispire centrifugiranjem u PBS-u tijekom 10 minuta na 1100 x g. Na kraju, supernatant se uklanja te se na talog stanica dodaje 250  $\mu$ L PBS pufera. Ovako pripremljene stanice analiziraju se protočnim citometrom.

### 3.2.9. Izdvajanje ukupne RNA iz kulture stanica

Za izdvajanje ukupne RNA iz stanica korišten je High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Postupak je proveden prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorcima se dodaje pufer za lizu koji omogućava razgradnju staničnih komponenti i inaktivaciju RNaza. Dobiveni lizat nanosi se na kolonu te se centrifugiranjem odvaja stanični debris, a nukleinske kiseline se vežu za filter kolone. DNA prisutna u uzorku razgrađuje se direktnim dodavanjem DNaze I na filter kolone. Sljedeći korak je ispiranje razgrađene DNA odnosno ostalih onečišćenja. Konačno, RNA se eluira s kolone u puferu za eluciju i pohranjuje pri -80°C.

### 3.2.10. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće RNA

Koncentracija RNA određuje se spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Otopina izdvojene RNA se dobro promiješa te se kratko centrifugira u mikrocentrifugirki kako bi se spustila na dno. Koncentracija RNA mjeri se na Nanodrop uređaju pri čemu se kao slijepa proba koristi pufer za eluciju iz kita za izdvajanje RNA. Uređaj se upali te se postavljanjem 2 µL slijepe probe zadaje nulta vrijednost, nakon čega se dodaje 2 µL uzorka i mjeri se apsorbancija pri valnim duljinama od 260 i 280 nm.

Koncentracija RNA se računa prema formuli:

$$[RNA]_{\mu\text{g/mL}} = A_{260} \times 44,19,$$

pri čemu je  $A_{260}$  apsorbancija u jedinicama optičke gustoće pri valnoj duljini od 260 nm, 44,19 je ekstincijski koeficijent RNA. Kako bi se odredila čistoća RNA izračunat je omjer apsorbancija  $A_{260}/A_{280}$  koji za čistu RNA iznosi 2,1. Kvaliteta RNA dodatno je provjerena nanošenjem na agarozni gel.

### 3.2.11. Obrnuto prepisivanje ukupne RNA

Za obrnuto prepisivanje (reverznu transkripciju, RT) ukupne RNA iz kulture stanica korišten je komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) te je postupak proveden prema uputama proizvođača. Komponente korištene za sintezu jednolančane komplementarne DNA (cDNA) iz ukupne RNA navedene su u tablici 7.

Tablica 7. Sastav reakcijske smjese RT.

Komponenta	Volumen/Reakciji ( $\mu\text{L}$ )
10x RT pufer	2.0
25x dNTP Miks (100 mM)	0.8
10x RT Nasumične Početnice (engl. <i>Random Primers</i> )	2.0
Reverzna Transkriptaza (engl. <i>Reverse Transcriptase</i> ) Multi Scribe™	1.0
Rnase Inhibitor	-
Voda bez nukleaze	4.2
<b>Ukupno po reakciji</b>	<b>10.0</b>

Nakon što se sve komponente dodaju, lagano se promiješaju. 10  $\mu\text{L}$  pripremljene smjese dodaje se u razrjeđenje RNA, koje se priprema s mqH<sub>2</sub>O, pri čemu količina RNA iznosi 600 ng. Takva reakcijska smjesa se promiješa te centrifugira kako bi se eliminirali mjehurići zraka. Mikroeprovete s uzorcima se drže na ledu sve do početka procesa reverzne transkripcije. Reakcijskoj smjesi RT dodaje se RNA i to tako da finalni volumen reakcije obrnutog prepisivanja bude 20  $\mu\text{L}$ . Uvjeti reakcije RT navedeni su u tablici 8.

Tablica 8. Uvjeti reakcije RT.

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

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

Pomoću Real Time RT-PCR, specifične sekvence komplementarne DNA (cDNA) se umnažaju te detektiraju. Umnažanje se provodi tako da se cDNA denaturira, potom se

specifične početnice vežu na sekvencu od interesa te na kraju dolazi do produljivanja početnica pomoću enzima DNA polimeraze. Nakon svakog ciklusa umnažanja DNA, količina DNA se mjeri pomoću fluorescentnog agensa Sybr green koji se veže na DNA te je fluorescentni signal direktno proporcionalan broju PCR produkta.

Kao početni uzorak korištena je cDNA dobivena obrnutim prepisivanjem izdvojene ukupne RNA. Sastav reakcijske smjese Real Time RT-PCR prikazan je u tablici 9, a uvjeti reakcije u tablici 10.

Tablica 9. Sastav reakcijske smjese Real Time RT-PCR

Sastojak	Volumen
Sybr green	7,5 $\mu$ L
Početnica 1	0,6 $\mu$ L
Početnica 2	0,6 $\mu$ L
m $\mu$ H <sub>2</sub> O	0,3 $\mu$ L
Uzorak	6 $\mu$ L
<b>Ukupno</b>	<b>15 <math>\mu</math>L</b>

Tablica 10. Uvjeti reakcije Real Time RT-PCR

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura (°C)	Vrijeme	Ciklus
Aktivacija	50	2 min	/
Denaturacija	95	10 min	1
Denaturacija	95	15 s	40-50
Sparivanje početnica i produljivanje lanaca DNA	60	1 min	

### 3.2.13. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE

Razdvajanje makromolekula u električnom polju se naziva elektroforeza. Za razdvajanje proteina elektroforezom, koristi se poliakrilamidni gel i natrij dodecil sulfat (SDS), detergent koji omogućava denaturaciju proteina. SDS je anionski detergent, što znači da proteini nakon što se SDS veže na njih poprime negativan naboj. Polipeptidni lanac veže količinu SDS-a proporcionalnu njegovoj relativnoj molekularnoj masi. Budući da je omjer



naboja i mase kod SDS-denaturiranih polipeptida sličan, razdvajanje proteina se bazira na razlici u masi.

Uzorci za analizu metodom SDS-PAGE pripremaju se tako da se stanice nasade u Petrijevu zdjelicu promjera 3.5 cm i to tako da gustoća iznosi  $5 \times 10^4$  stanica po zdjelici. Potom se stanice transficiraju specifičnom siRNA i/ili inficiraju adenovirusom te skupljaju metodom vrućeg pufera. Kako bi se stanice skupile, u zdjelicu se nanese 500  $\mu$ L PBS pufera za ispiranje te se pufer ukloni. Nakon toga se doda 200  $\mu$ L pufera za nanašanje uzorka (engl. *sample buffer*, SB), koji se prethodno zagrije na 96°C. SB je 6x koncentriran te ga je potrebno razrijediti do 1x. Stanice se sastrugaju strugalicom koja se dezinficira u etanolu te ispire u PBS puferu i potom posuši. Uzorci se mogu odmah koristiti ili se čuvaju na -20°C.

Prije SDS-elektroforeze, uzorci se moraju sonicirati, kako bi se dobio proteinski ekstrakt iz stanica. Soniciranje označava disrupciju staničnog materijala, čime se olakšava denaturiranje proteina zagrijavanjem te posljedično dobiva visok udjel proteina iz stanica. Sonda ultrazvuka se prebriše etanolom, a na uređaju se namjesti amplitura na 30 Hz. Uzorak se zagrije na 96°C te se nakon zagrijavanja sonda zaroni u uzorak i sonicira 5 sekundi, nakon čega slijedi 5 sekundi stavljanja na led. Taj postupak se ponovi još 2 puta. Uzorci se mogu smrznuti na -20°C ili koristiti za analizu, pri čemu ih je potrebno zagrijati na 96°C prije nanošenja u gel.

Proteini iz uzorka razdvajaju se diskontinuiranom elektroforezom korištenjem dva gela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje, puferirani kod različitog pH.

Prvo se izlijeva gel za razdvajanje proteina. Sastav gela za razdvajanje proteina prikazan je u tablici 11.

Tablica 11. Sastav gela za razdvajanje proteina.

<b>Gel za razdvajanje</b>	
<b>10%-tni</b>	
diH <sub>2</sub> O [mL]	4.0
AA/Bis (30% otopina akrilamida) [mL]	3.3
Tris-HCl pH 6,8 [mL]	2.5
10% (w/v) SDS [mL]	0.1
10% (w/v) APS [mL]	0.1
TEMED [mL]	0.006
<b>Ukupni volumen</b>	<b>10 mL</b>

Nakon dodatka TEMED-a, smjesa se izlije u kalup te se ravnomjerno nadsvođi vodom ili etanolom. Gel se ostavlja kako bi se polimerizirao tijekom jednog sata, a nakon polimerizacije, ukloni se voda, odnosno etanol kojom je polimerizirani gel bio nadsvođen.

Idući korak je priprema smjese za gel za sabijanje proteina (gornji gel). Sastav gela za sabijanje proteina prikazan je u tablici 12.

Tablica 12. Sastav gela za sabijanje proteina.

<b>Gel za sabijanje</b>	
<b>5%-tni</b>	
diH <sub>2</sub> O [mL]	2.1
AA/Bis (30% otopina akrilamida) [mL]	0.5
Tris-HCl pH 8,8 [mL]	0.38
10% (w/v) SDS [mL]	0.03
10% (w/v) APS [mL]	0.03
TEMED [mL]	0.003
<b>Ukupni volumen</b>	<b>3 mL</b>

Otopina se izlije na polimerizirani donji gel i odmah se u nju uroni češljic te se ostavi da polimerizira tijekom jednog sata. Nakon završetka polimerizacije, češljic se izvadi iz gornjeg gela te se složi aparatura za elektroforezu. Dodaje se pufer za elektroforezu u gornji spremnik, a proteinski uzorci prethodno sonicirani, zagriju se na 96°C te se nanese

30  $\mu$ L (okvirno 30  $\mu$ g ukupnih proteina) uzorka po jažici gela. U jednu jažicu gela nanese se potrebna količina standarda za određivanje molekulske mase proteina (prema uputama proizvođača). Potom se aparatura za elektroforezu poklopi, priključe se elektrode na izvor napajanja te započinje elektroforezu. Napon je tijekom cijele elektroforeze konstantan te iznosi 100 V, a elektroforeza traje između 1 sat 40 minuta i 2 sata 30 minuta.

#### 3.2.14. Western blot

Western blot je analitička metoda za detekciju i analizu proteina, koja se bazira na vezanju specifičnog protutijela na protein od interesa te njegovu detekciju. Specifičnost interakcije između proteina i protutijela omogućava identifikaciju ciljanog proteina u smjesi proteina.

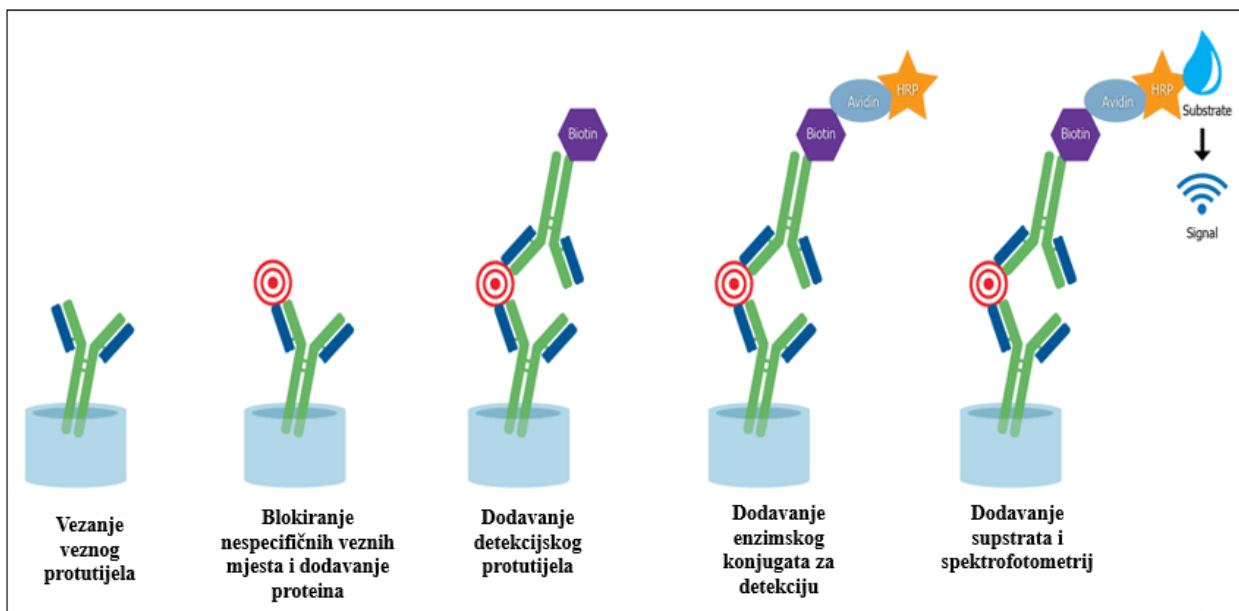
Nakon završene SDS-elektroforeze, proteini se električnim transferom u transfer puferu pri 400 mA tijekom 90 minuta prenesu na nitroceluloznu membranu. Nakon prijenosa proteina membrana se ispire u TBS-T puferu u trajanju od 5 minuta, te boji u otopini za bojanje (engl. *Amidoblack*) u trajanju 1 minutu. Membrana se odbojava u otopini za ispiranje tri puta po dvije minute. Nakon toga membrana se ispire 30 minuta u TBS-T puferu te blokira 1 sat u 5% otopini mlijeka u prahu u puferu TBS-T kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela. Nakon blokiranja, membrana se inkubira s primarnom protutijelom koje se razrjeđuje u 5% otopini mlijeka u prahu u puferu TBS-T. Inkubacija traje preko noći na 4°C. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom membrana se ispire 30 minuta u TBS-T puferu nakon čega slijedi inkubacija sa razrjeđenim sekundarnim protutijelom, u 5% otopini mlijeka u prahu u puferu TBS-T, a sekundarno protutijelo je obilježeno sa enzimom HRP (engl. horseradish peroxidase). Inkubacija se provodi 2 sata, nakon čega slijedi ispiranje u TBS-T puferu 30 minuta. Vizualizacija proteina se bazira na kemiluminiscenciji, pri čemu dolazi do emisije svjetla tijekom katalize luminola pomoću HRP i vodikovog peroksida. U tu svrhu se na membranu dodaje ECL™ (Entry-level peroxidase substrate for enhanced chemiluminescence) detekcijski reagens, koji se sastoji od dvije komponente, luminol supstrata i vodikovog peroksida. Emitirana svjetlost se detektira na filmu pomoću razvijača i fiksatora ili pomoću uređaja Uvitec.

#### 3.2.15. Određivanje specifičnih antigena ELISA testom (Sandwich ELISA)

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) je metoda koja se bazira na visokoj specifičnosti interakcija između protutijela i antigena te je ovom metodom moguće

detektirati i kvantificirati proteine. Kod "Sandwich ELISA" prvi korak je vezanje veznog protutijela za bunariće pločice. Potom se dodaje smjesa proteina, pri čemu dolazi do vezanja antigena na vezno protutijelo, a nakon toga se dodaje detekcijsko protutijelo, specifično za određeni antigen. U bunariću dolazi do stvaranja kompleksa antigen-protutijelo, a detekcijsko protutijelo na sebi ima vezan određeni marker, poput biotina. U smjesu se zatim dodaje avidin-HRP otopina, te dolazi do vezanja avidina na biotin. HRP je enzim peroksidaza, izolirana iz hrena, koji prevodi naknadno dodani supstrat u kolorimetrijski produkt, koji se potom mjeri spektrofotometrijski.

Stanice su nasađene na pločicu sa 6 bunarića, pri čemu je gustoća stanica između  $2 \times 10^5$  –  $5 \times 10^5$  po bunariću. Nakon utišavanja i infekcije, supernatant, u kojemu se nalaze izlučeni proteini, se skuplja te zamrzava pri  $-20^\circ\text{C}$ . Kako bi se detektirali specifični proteini, provodi se ELISA test po uputama proizvođača (Slika 8.).



Slika 8. Shematski prikaz određivanja specifičnih antigena ELISA testom (<https://rockland-inc.com/ELISA-Kits.aspx>).

### 3.2.16. Transfekcija i izdvajanje stabilno transficiranih staničnih linija

Transfekcija je metoda unosa strane molekule DNA u stanicu eukariota. Postoji nekoliko načina unosa DNA u stanicu, a najčešće se koriste transfekcija pomoću kalcijevog fosfata i lipofekcija (pomoću liposoma). U ovom radu korišten je komercijalno dostupan transfekcijski reagens Lipofectamine. Stanice se nasade u Petrijevu zdjelicu promjera 3.5

cm ( $10^5$  stanica/mL). Plazmidna DNA (ukupno 2.5  $\mu$ g) otopi se u mikroepreveti 1 u 250  $\mu$ L OptiMEM-a. U mikroepreveti 2 pomiješa se 12  $\mu$ L Lipofectamina u 250  $\mu$ L OptiMEM-a. Sadržaj dviju mikroepreveta se pomiješa i ostavi 5 min pri sobnoj temperaturi. Ovako pripremljena smjesa nakapana se na stanice koje su ostavljene 24 sata u inkubatoru. Za transfekciju stanica korištene su dvije različite DNA: sh(-) kao negativna kontrola i sh(TLR9) koja je korištena za utišavanje TLR9. shRNA molekule (engl. *short hairpin RNA*) su male RNA molekule koje mogu tvoriti strukturu ukosnice te na taj način omogućavaju utišavanje specifičnog gena. Plazmidi koji kodiraju za sh(-) odnosno shTLR9 dobiveni su od dr. sc. Johannea Tuomela, Turku, Finska.

Da bi se mogli izdvojiti klonovi stanica koje sadrže stabilno ugrađen transficirani plazmid, plazmidni vektor s odabranim genom mora sadržavati i gen za otpornost na neki antibiotik. Uzgojem stanica u prisutnosti tog antibiotika izrast će samo oni klonovi stanica koji su stekli otpornost zahvaljujući stabilnoj ugradnji plazmida. Geneticin (G418, Gibco BRL Life Technologies, Inc) je aminoglikozidni antibiotik topiv u vodi koji blokira sintezu polipeptida inhibicijom koraka elongacije i u prokariotskim i eukariotskim stanicama. U sh(-) i sh(TLR9) plazmidima nalazi se gen za otpornost na geneticin te se stoga geneticin koristi za odabir stabilnih transfektanata. 24 sata nakon transfekcije, stanice se odvajaju od podloge uz pomoć tripsina te se razdjeljuju u Petrijeve zdjelice promjera 3,5 cm s tim da je ukupna površina na koju se stanice nasađuju 20 puta veća od početne površine Petrijeve zdjelice u kojoj je izvršena transfekcija. U svrhu odabira klonova stabilno transficiranim plazmidom koji u sebi sadrži odabrani gen, u hranjivu podlogu dodaje se geneticin (600  $\mu$ g/mL). Tekuća hranjiva podloga s geneticinom mijenja se svakih četiri do pet dana do pojave otpornih kolonija. Pojedinačne kolonije (klonovi stanica) izdvojene su struganjem sterilnim plastičnim nastavkom za mikropipetu i prenesene u bunariće pločice s 96 bunarića u koje se prethodno dodaje 200  $\mu$ L hranjive podloge DMEM-FBS sa geneticinom. Rast tako izdvojenih klonova prati se svaki dan do trenutka kada stanice ispune bunarić. Tada se tripsinom odvajaju od podloge i prenose u pločice s 24 bunarića, zatim pločice s 6 bunarića (sve veća površina za rast), sve dok se ne dostigne dovoljan broj stanica za analizu.

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

U ovom radu korišten je replikacijski defektni adenovirusni vektor AdV26, koji kao gen dojavljivač ima ugrađen gen koji kodira za zeleni fluorescentni protein (GFP, engl. *green fluorescent protein*), a koji su konstruirali Abbink i sur. (2007). AdV26 se danas intenzivno istražuje kao vektorska vakcina međutim podaci vezani uz bazičnu biologiju ovog adenovirusa su još uvijek nedostatni.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati ulogu proteina TLR9 u imunom odgovoru epitelnih stanica nakon infekcije AdV26. Iako epitelne stanice nisu klasične stanice imunog sustava, pokazano je da mogu sudjelovati u oblikovanju imunog odgovora (Schleimer i sur., 2009). Kao model odabrana je stanična linija A549 u kojoj je korištenjem specifične siRNA smanjena ekspresija TLR9 receptora. Uspješnost utišavanja provjerena je western blot analizom. AdV26 je umnožen i pročišćen te mu je određena koncentracija. Određena je uspješnost transdukcije AdV26 na stanicama A549, sa i bez utišavanja TLR9 receptora. Uspješnost transdukcije određena je protočnim citometrom. Nadalje, A549 stanice s utišanim i neutišanim TLR9 su inficirane s AdV26 vektorom, te je određena razina ekspresije gena koji sudjeluju u imunom odgovoru stanice metodom Real Time RT-PCR). Kao početni uzorak korištena je komplementarna DNA (cDNA) dobivena obrnutim prepisivanjem izdvojene ukupne RNA, a kao kontrola su korištene neinficirane A549 stanice s utišanim i neutišanim TLR9. Također, za iste molekule koje sudjeluju u imunom odgovoru stanice, proučavana je i razina ekspresije proteina izlučenih u podlogu, metodom ELISA. Budući da su rezultati ukazivali na razliku između kontrolnih i inficiranih stanica, kao i stanica s utišanim i neutišanim TLR9, uslijedila je analiza razine ekspresije proteina koji sudjeluju u aktivaciji transkripcije citokina i kemokina, istraživanih metodama RT-PCR i ELISA. Proteini su razdvojeni metodom SDS-elektroforeze te detektirani western blot analizom. Također su izdvojene A549 stanice stabilno transficirane sa sh(TLR9), odnosno sh(-) kao kontrolom.

U radu je istraživana uloga TLR9, kao potencijalne molekule koja može prepoznati AdV26. Dobiveni rezultati ukazuju da AdV26 nakon ulaska u stanice A549 potiče urođeni imunski odgovor. Nakon infekcije AdV26, dobivena je povećana ekspresija gena koji kodiraju za IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$  te IFN- $\beta$ , a smanjena ekspresija gena koji kodira za IFN- $\alpha$ 1. Također, identificirano je povećano lučenje proteina IL-6 i IL-8 u supernatant stanica. U stanicama sa smanjenom ekspresijom TLR9 imunski odgovor potaknut infekcijom AdV26 bio je manji za većinu promatranih gena, u odnosu na stanice

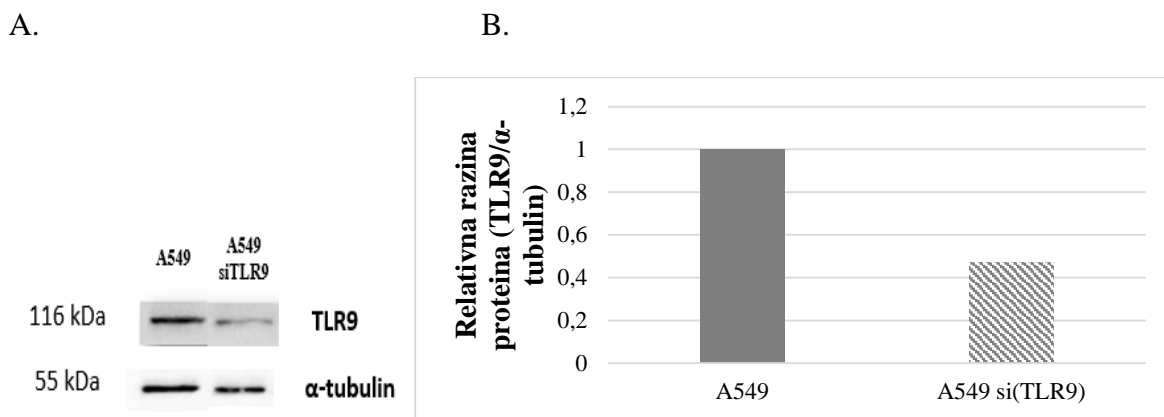
u kojima TLR9 nije bio utišan. Osim toga, iz rezultata se vidi kako AdV26 bolje inficira stanice sa utišanim TLR9, što do sad nije bilo poznato.

#### **4.1. siRNA POSREDOVANO UTIŠAVANJE TLR9 PROTEINA**

Mnogi virusi ulaze u stanicu pomoću endosoma te mogu biti detektirani posredstvom TLR receptora koji se nalaze na membrani endosoma. TLR -3, -7, -8 i -9 se nalaze na membrani endosoma te prepoznaju nukleinske kiseline, pri čemu TLR9 može prepoznati dvolančanu DNA molekulu (Kumar i Kawai, 2009). Pokazano je da TLR9 prepoznaje DNA virusa, uključujući DNA adenovirusa (O’neill i sur., 2009). Prepoznavanje virusne DNA pomoću TLR9 proteina potiče urođeni imunski odgovor u stanici (Guggemoos i sur., 2008; Zhao, 2011).

Kako bi se istražila aktivacija urođenog imunskog odgovora potaknuta vezanjem AdV26, gen koji kodira za TLR9 protein utišan je pomoću specifične siRNA molekule za TLR9. Uspješnost utišavanja je provjerena western blot analizom (Slika 9A.). Osim detekcije specifične vrpce za TLR9, protein veličine 116 kDa, detektirala se i vrpca specifična za  $\alpha$ -tubulin veličine 55 kDa koji je korištena kao standard za normalizaciju količine TLR9 proteina. Rezultati dobivenih vrpca i usporedba razine proteina TLR9 između kontrolnih A549 stanica i stanica s utišanim TLR9 specifičnom siRNA za TLR9 su prikazani na slici 8. Količina proteina TLR9 u A549 stanicama s utišanim TLR9 manja je u odnosu na kontrolne stanice pri čemu je denzitometrijom određeno da je uspješnost utišavanja 54% (Slika 9B.). U nastavku ovog rada u svim pokusima su korišteni isti uvjeti utišavanja TLR9.



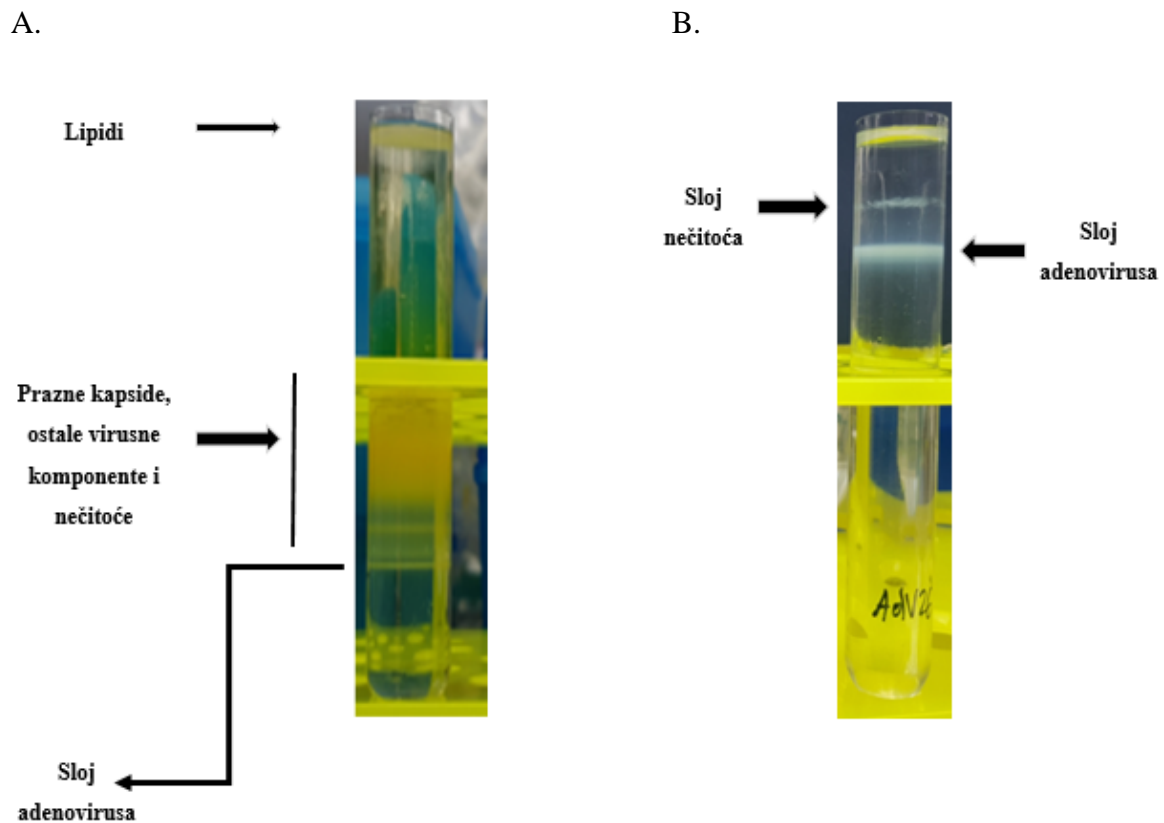


**Slika 9. Usporedba razine ekspresije proteina TLR9 detektirana western analizom.**

A549 stanice nasadene su u pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću). Nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. Uzorci su prikupljeni metodom vrućeg pufera, a uspješnost utišavanja je provjerena western blot analizom. Na slici A prikazane su specifične vrpce u utišanim i neutišanim stanicama za protein TLR9, veličine 116 kDa i protein  $\alpha$ -tubulin veličine, 55 kDa. Na slici B su prikazane vrijednosti za TLR9 normalizirane prema proteinu  $\alpha$ -tubulin, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na neutišane A549 stanice. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

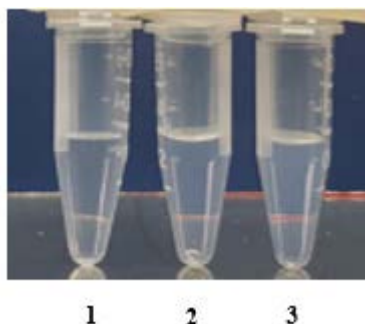
#### 4.2. PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSA

Kako bi se umnažio replikacijski defektan AdV26, korištene su HEK-293 stanice koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma. Nakon namnožavanja virus je pročišćen centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu CsCl kao što je opisano u poglavlju 3.2.5. Na slici 10. su prikazane epruvete za centrifugiranje nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl, te nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl. Sloj adenovirusa je nakon centrifugiranja u oba slučaja jasno odvojen od nečelovitih adenovirusnih čestica i nečistoća te je označen strelicom. Sloj ukoncentriranog AdV26 je bjeličast te oštih rubova.



Slika 10. Slojevi ukoncentriranih AdV26 nakon ultracentrifugiranja u CsCl. Na slici A prikazani su slojevi dobiveni nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl. Sloj ukoncentriranog adenovirusa se nalazi na označenoj granici različitih gustoća CsCl. Osim toga, označeni su slojevi koji predstavljaju prazne kapside, komponente citopazme uključujući i proteine kapside te lipide (Wold i sur., 2007). Na slici B prikazan je sloj adenovirusa nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl u području koje odgovara gustoći adenovirusne čestice, 1,34 g/mL.

Nakon ultracentrifugiranja je uslijedilo uklanjanje CsCl tehnikom gel-filtracije pomoću kolone Sephadex G-25M. Na slici 11. su prikazane dobivene frakcije u kojima se nalaze virusi, a od onih bez virusa se razlikuju po tome što su bjeličaste boje s konkavnom površinom.

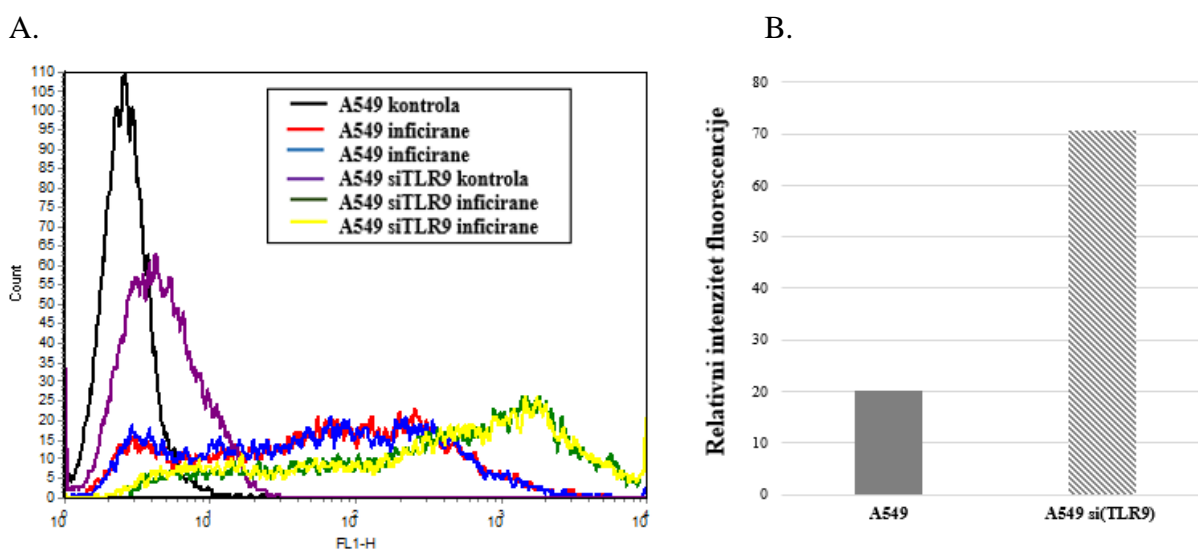


Slika 11. **Frakcije dobivene nakon uklanjanja CsCl pomoću kolone Sephadex G-25M.** Kako bi se uklonio CsCl nakon ultracentrifugiranja, provedena je gel-filtracija pomoću kolone Sephadex G-25M. Kolona se 6 puta ispirala s po 5 mL pufera PBS. Frakcije bez virusa su prozirne, ravne površine, a frakcije s virusima su bjeličaste boje s konkavnom površinom. Epruveta 1 – frakcija bez virusa, epruvete 2 i 3 – frakcije s virusima.

Nakon pročišćavanja, izmjerena je koncentracija adenovirusnih čestica koja je iznosila  $1,8 \times 10^{12}$  virusnih čestica/mL.

### 4.3. UTIŠAVANJE TLR9 POVEĆAVA USPJEŠNOST TRANSDUKCIJE AdV26

Trenutno u literaturi nema podataka o utjecaju TLR9 na transdukciju adenovirusom. Da bi se ispitala uloga TLR9 u uspješnosti transdukcije AdV26 A549 stanice, sa i bez utišavanja TLR9, su inficirane s AdV26. Nakon transdukcije, stanice su analizirane protočnim citometrom. Kao kontrola su korištene neinficirane stanice, bez utišanog TLR9, odnosno s utišanim TLR9. Rezultati uspješnosti transdukcije prikazani su na slici 12.



Slika 12. **Određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusom u A549 stanicama, sa i bez utišavanja TLR9.** Stanice su nasađene u pločicu sa 12 bunarića ( $10^4$  stanica po bunariću), a nakon 24 sata stanicama u jednom bunariću je utišan TLR9 protein specifičnom siRNA. 72 sata nakon utišavanja, stanice su inficirane s AdV26 (MOI iznosi  $5 \times 10^4$  virusnih čestica po stanici). Nakon 48 sati inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, uspješnost transdukcije određena je protočnim citometrom. Na slici A. su prikazane vrijednosti FL1-H, odnosno detektirana fluorescencija, u ovisnosti o broju

stanica. Mjerenja su rađena u paraleli. Na slici B. se nalazi grafički prikaz uspješnosti transdukcije inficiranih TLR9 utišanih i neutišanih A549 stanica.

Iz dobivenih rezultati vidi se da AdV26 bolje inficira stanice koje imaju smanjenu ekspresiju TLR9 proteina i to 3.5 puta u odnosu na neutišane stanice. Moguće objašnjenje je nemogućnost stanice s utišanim TLR9 da prepozna viralnu dsDNA te je posljedično infekcija u stanicama s utišanim TLR9 bolja. Dodatno, s obzirom da se TLR9 nalazi u membrani endosoma moguće je da je utišavanje TLR9 dovelo do narušavanja strukture endosoma, a samim time i promjene u unutarstaničnom putovanju AdV26. U literaturi trenutno nema podataka koji bi povezali utišavanje TLR9 i uspješnost transdukcije adenovirusima.

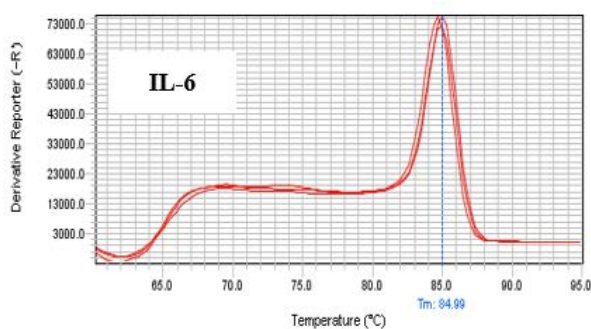
#### **4.4. UTJECAJ UTIŠAVANJA TLR9 NA EKSPRESIJU GENA UKLJUČENIH U UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR NAKON INFEKCIJE AdV26**

Nakon što virusi inficiraju stanicu, dolazi do aktivacije urođenog imunskog odgovora, kao prve linije obrane od virusa. Jedna od glavnih karakteristika urođenog imunskog odgovora je indukcija proupalnih citokina i kemokina, a između ulaska virusa u stanicu domaćina do ekspresije proupalnih molekula, nalazi se kompleksna signalna kaskada reakcija (Zhao, 2011). Iz literature je poznato da adenovirusi prilikom infekcije stanice potiču urođeni imunski odgovor. Pokazano da u slučaju adenovirusa podgrupe C (AdV5) i adenovirusa podgrupe B (AdV35) prijenos signala uključenih u imunski odgovor može biti posredovan TLR9 (Iacobelli Martinez i Nemerow, 2007; Zhu i sur., 2007). Da bi se istražila uloga TLR9 u poticanju urođenog imunskog odgovora epitelnih stanica nakon infekcije AdV26 određena je ekspresija nekoliko gena uključenih u urođeni imunski odgovor u stanicama u kojima je utišan TLR9. Istraživani geni uključuju: IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$  i MyD88.

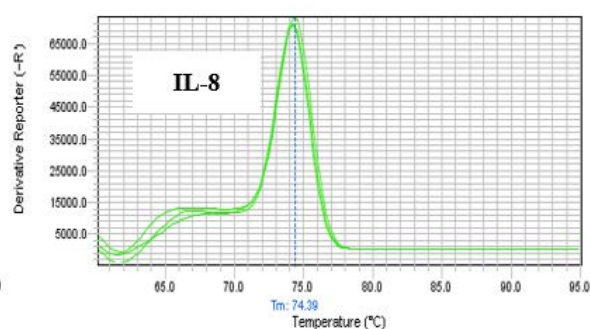
Nakon izolacije i provjere čistoće RNA inficiranih i kontrolnih A549 stanica s utišanim i neutišanim TLR9, uslijedilo je obrnuto prepisivanje RNA, čime je dobivena komplementarna DNA (cDNA). Dobivena cDNA korištena je za umnažanje i detekciju specifičnih slijedova pomoću Real time RT-PCR metode te je na taj način analiziran utjecaj utišavanja TLR9 na poticanje urođenog imunskog odgovora nakon infekcije na razini mRNA.

Prije izvođenja Real Time RT-PCR-a provjerena je specifičnost početnica za pojedini gen, pri čemu su analizirane krivulje taljenja. Krivulja taljenja je temperatura pri kojoj je denaturirano 50% DNA, a koristi se kako bi se procjenila karakteristika disocijacije dvolančane DNA tijekom zagrijavanja budući da povećanjem temperature dolazi do disocijacije lanaca. Krivulje taljenja za gene IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$  i MyD88 prikazane su na slici 13. Iz oblika krivulje vidljivo je da početnice omogućuju specifično umnažanje ciljnog gena te se mogu koristiti za detekciju ekspresije mRNA gore navedenih kemokina i citokina u A549 stanicama.

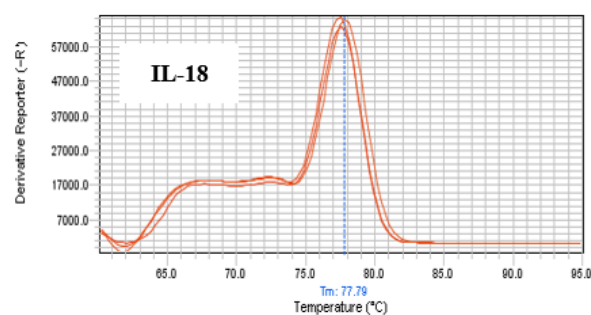
A.



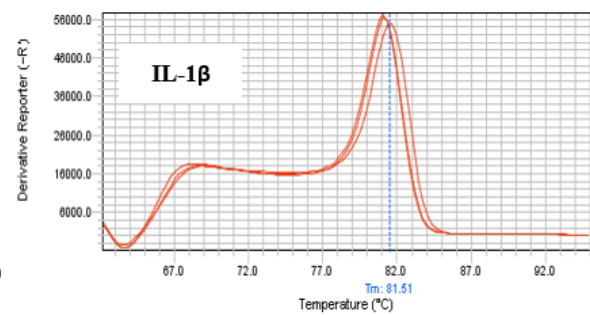
B.



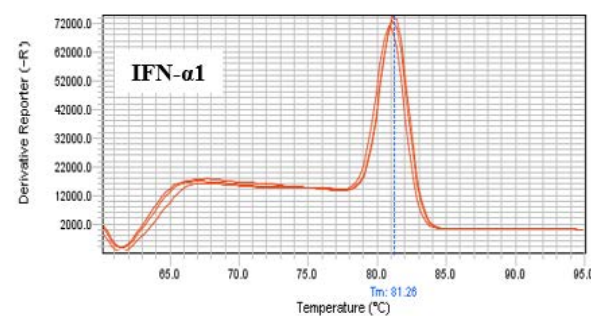
C.



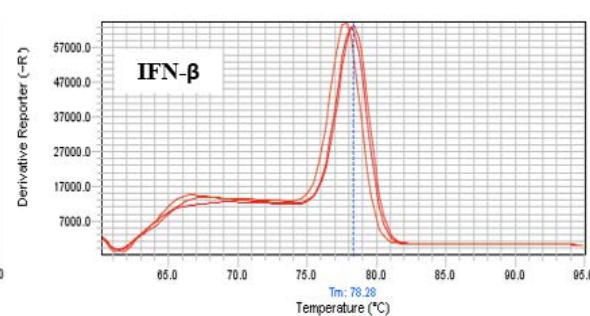
D.



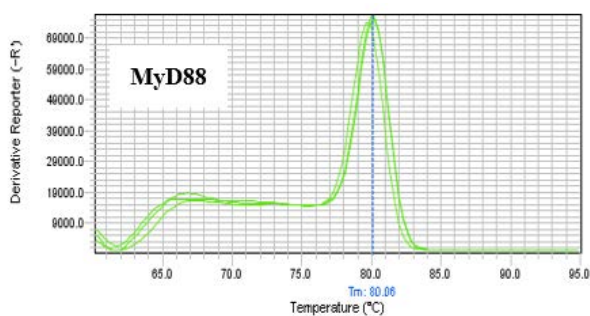
E.



F.



G.

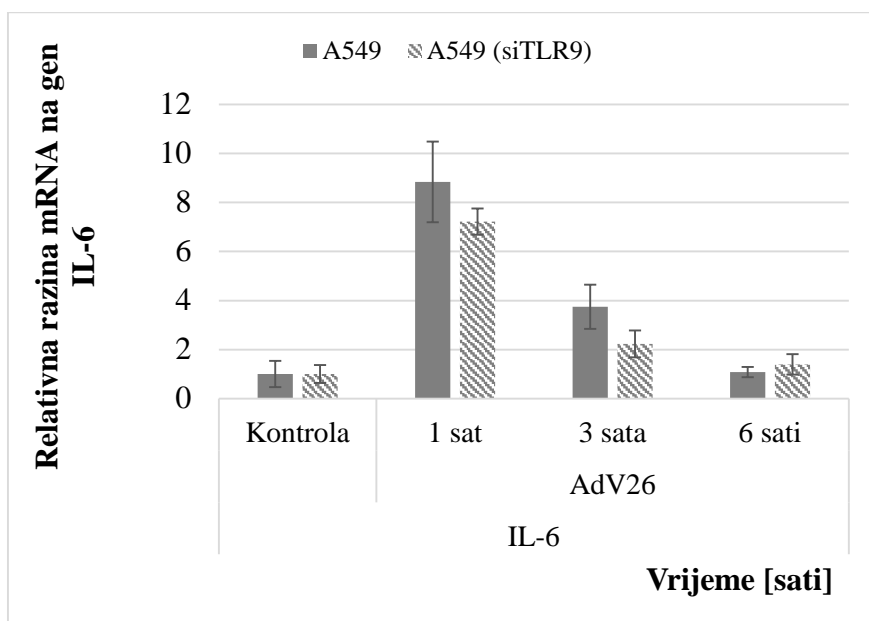


Slika 13. **Krivulje taljenja za ispitivane gene.** A. IL-6, B. IL-8, C. IL-18, D. IL-1 $\beta$ , E. IFN-  $\alpha$ 1, F. IFN- $\beta$ , G. MyD88.

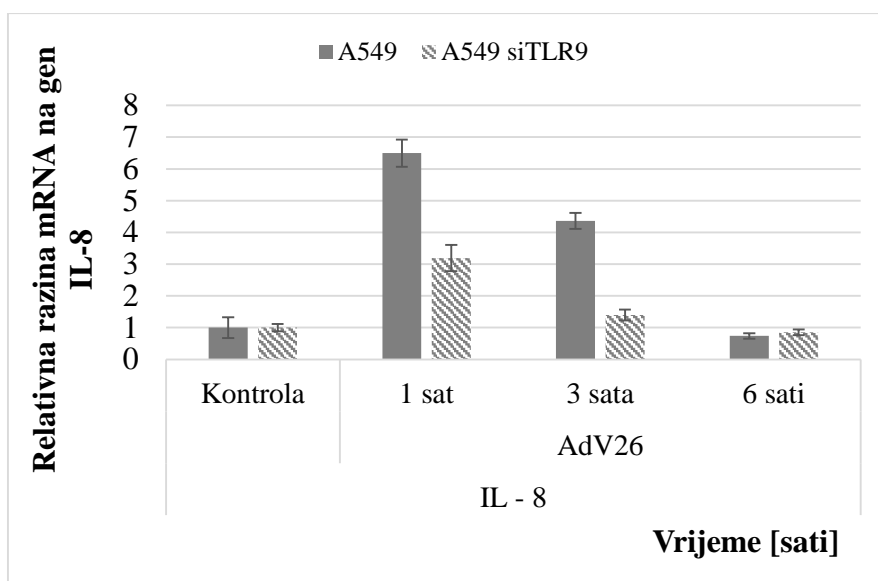
#### 4.4.1. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodiraju za IL-6 i IL-8

Lučenje proupalnih citokina i kemokina može biti toksično za organizam te imati negativan učinak na adenovirusne vektore. Iz literature je poznato da infekcija adenovirusima potiče transkripciju gena za IL-6 i IL-8 (Hendrickx i sur., 2014). Također je poznato da AdV26 potiče nastanak znatno veće razine proupalnih citokina i kemokina nego AdV5 (Teigler i sur., 2014). Mehanizam kojim AdV26 potiče nastanak IL-6 i IL-8 nije poznat. Da bi se istražilo da li infekcija A549 stanica s AdV26 potiče ekspresiju gena za IL-6 i IL8, te da li TLR9 ima ulogu u tom procesu određena je ekspresija gore navedenih gena u A549 stanicama s utišanim i neutišanim TLR9, nakon infekcije AdV26. Ekspresija gena mjerena je na uzorcima koji su sakupljeni u 1. 3. i 6. satu infekcije. Rezultati relativne ekspresije gena za IL-6 i IL-8 u kontrolnim A549 stanicama i stanicama s utišanim TLR9 nakon infekcije AdV26 su prikazani na slici 14.

A.



B.



Slika 14. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju mRNA analiziran metodom Real Time RT-PCR na gene IL-6 i IL-8 nakon infekcije Adv26. A549 stanice nasadene su u pločice s 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću), a nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane s Adv26 (MOI:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Uzorci su prikupljeni 1 sat, 3 sata i 6 sati nakon infekcije, odvajanjem stanica od podloge tripsinom i centrifugiranjem (10 minuta pri 1100 x g). Praćena je razina ekspresije mRNA na gene IL-6 (A) i IL-8 (B) metodom Real Time RT-PCR. Rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i

neutišane A549 stanice koje nisu inficirane s Adv26. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

Promjene u razini mRNA za gene IL-6 i IL-8 uočene su između kontrolnih A549 stanica i stanica u kojima je utišana ekspresija TLR9. Ekspresija IL-6 i IL-8 različita je također i u svakoj promatranoj vremenskoj točki nakon infekcije s Adv26. Sat vremena nakon infekcije, vidi se značajno povećanje ekspresije gena za IL-6 kako u utišanim tako i u kontrolnim neutišanim stanicama, pri čemu je povećanje ekspresije gena za IL-6 manje u stanicama u kojima je utišan TLR9. Povećanje ekspresije gena za IL-6 vidljivo je još i 3 sata nakon infekcije, dok je nakon 6 sati razina ekspresije gotovo jednaka kontrolnoj, odnosno vrijednosti u neinficiranim stanicama (Slika 13 A.).

Citokin IL-6 uključen je u imunski odgovor organizma nakon Ad infekcije. Tako su npr. Zsengeller i sur. 30 minuta nakon infekcije s Adv5 u alveolarnim makrofagima, ali ne i plućnim epitelnim ili vaskularnim endotelnim stanicama, dobili značajno povećanje u razini ekspresije mRNA koja kodira za IL-6 (Zhang i sur., 2000). Za razliku od podataka dobivenih u *in vitro* pokusima, u *in vivo* istraživanju infekcija rezus majmuna Adv5 vektorskom vakcinom nije potaknula lučenje IL-6 (Teigler i sur., 2012). U istom radu pokazano je da nakon infekcije s Adv26 dolazi do povećanja ekspresije IL-6 što je u skladu sa rezultatima dobivenima u ovom radu.

Mjerenjem razine mRNA koja kodira za IL-8 u ovom su radu dobivene povećane vrijednosti nakon infekcije s Adv26, te se može uočiti sličan trend povećanja ekspresije gena za IL-6 i IL-8, pri čemu je utišavanje TLR9 imalo veći utjecaj na ekspresiju IL-8 nego na ekspresiju IL-6. Jedan sat nakon infekcije Adv26 razina ekspresije IL-8 manja je za 50% u stanicama u kojima je utišan TLR9 u odnosu na neutišane stanice, dok je 3 sata nakon infekcije ekspresija gena za IL-8 u stanicama u kojima je utišan TLR9 već gotovo usporediva s neinficiranim stanicama (Slika 13B.). U istraživanjima Nazir i sur. (2005) na stanicama pluća su uočene povećane razine neutrofilnih kemokina, poput MIP-2 i KC nakon infekcije s Adv3 i Adv7 (podgrupa B), pri čemu je KC u mišu homolog humanom IL-8. Osim toga, lučenje IL-8 je nakon infekcije s Adv7 inducirano i u plućnim epitelnim stanicama u kulturi stanica ili u ljudskom tkivu (Booth i sur., 1999; Booth i sur., 2004; Alcorn i sur., 2001). Povećana ekspresija gena za IL-8 pokazana je i u fibroblastima rožnice čovjeka nakon infekcije Adv19 (podgrupa D) (Natarajan i sur., 2003).

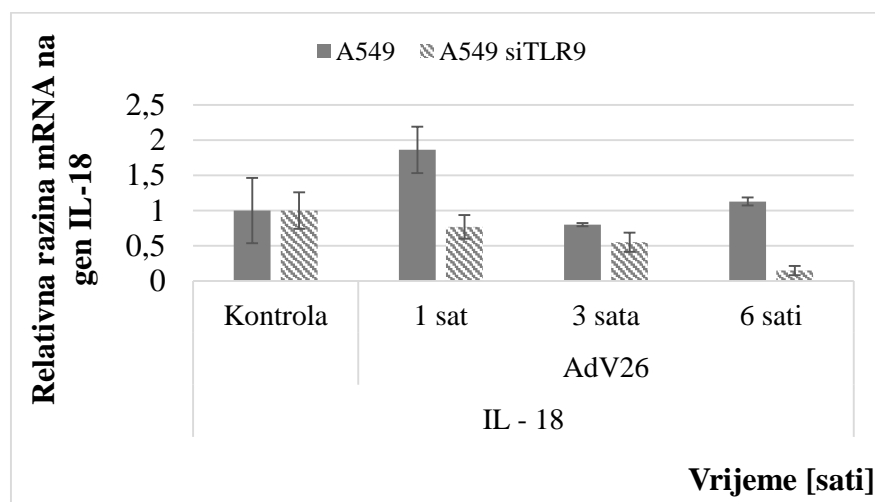


Povećanje ekspresije IL-6 i IL-8 nakon infekcije s AdV26 koje je uočeno u ovom radu u skladu je s dosad objavljenim istraživanjima. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju IL-6 do sada je ispitan samo za AdV5 te je pokazano da u makrofagima miša sa mutiranim TLR9 nakon infekcije s AdV5 dolazi do smanjene ekspresije IL-6 u odnosu na kontrolne stanice (Cerullo i sur., 2007). Koliko je nama poznato, utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju IL-8 nakon infekcije adenovirusa da sada nije istraživano.

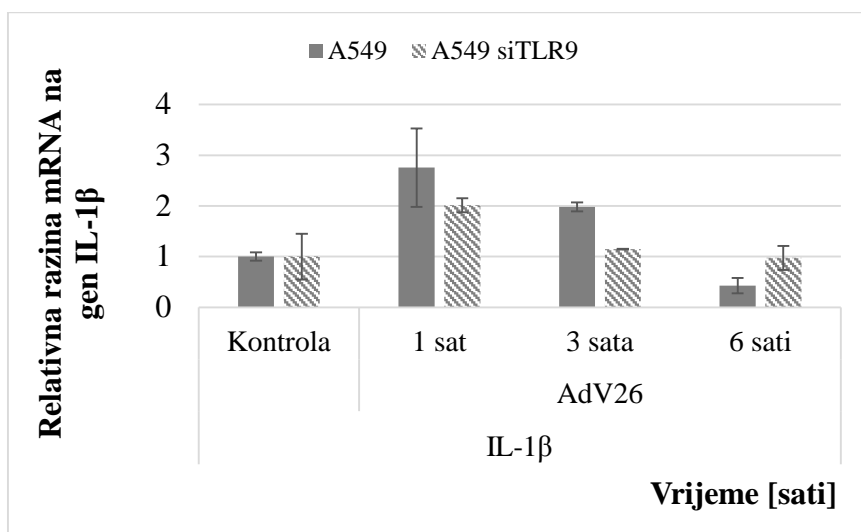
#### 4.4.2. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodiraju za IL-18 i IL-1 $\beta$

Inflamasom je citosolni proteinski kompleks koji može prepoznati patogene. Infekcija virusom potiče aktivaciju inflamasoma. Nakon toga dolazi do aktivacije kaspaze-1 koja procesira IL-18 i IL-1 $\beta$ . Iz literature je poznato da oslobađanje AdV5 iz endosoma potiče aktivaciju inflamasoma i posljedično ekspresiju IL-1 $\beta$ . Također je pokazano da je aktivacija inflamasoma ovisna o TLR9 (Kumar i sur., 2009). Da bi se istražilo da li infekcija AdV26 potiče ekspresiju IL-1 $\beta$  i IL-18 u ovom je radu mjerena količina mRNA gena IL-18 i IL-1 $\beta$  i to u kontrolnim A549 stanicama sa nepromijenjenom ekspresijom TLR9 i u stanicama u kojima je utišan TLR9. Ekspresija IL-1 $\beta$  i IL-18 određena je i nakon infekcije AdV26 i to 1, 3 i 6 sati nakon infekcije. Rezultati relativne ekspresije gena za IL-1 $\beta$  i IL-18 u kontrolnim A549 stanicama i stanicama s utišanim TLR9 nakon infekcije AdV26 su prikazani na slici 15.

A.



B.



Slika 15. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju mRNA analiziran metodom Real Time RT-PCR na gene IL-18 i IL-1β nakon infekcije AdV26. A549 stanice nasađene su u pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću), a nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane AdV26 (MOI:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Uzorci su prikupljeni 1, 3 i 6 sati nakon infekcije, odvajanjem stanica od podloge tripsinom i centrifugiranjem (10 minuta pri 1100 x g). Praćena je razina ekspresije mRNA na gene IL-18 (A) i IL-1β (B) metodom Real Time RT-PCR. Rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549 stanice koje nisu inficirane s AdV26. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

Infekcija A549 stanica s AdV26 povećava ekspresiju gena za IL-1β (slika 14 A.) i IL-18 (slika 14 B.), iako je povećanje ekspresije IL-18 vrlo malo. Povećanje ekspresije oba promatrana gena najveće je 1 sat nakon infekcije, nakon čega se ekspresija smanjuje prema vrijednosti kontrolnih stanica. Ekspresija IL-1β i IL-18 potaknuta infekcijom AdV26 ovisna je o TLR9. Naime ekspresija ovih gena je u A549 stanicama s utišanim TLR9 bila manja u usporedbi s kontrolnim stanicama. Zanimljivo je da je u stanicama s utišanim TLR9 ekspresija IL-18 nakon infekcije s AdV26 bila manja nego u kontrolnim stanicama i to u sva tri promatrana vremena.

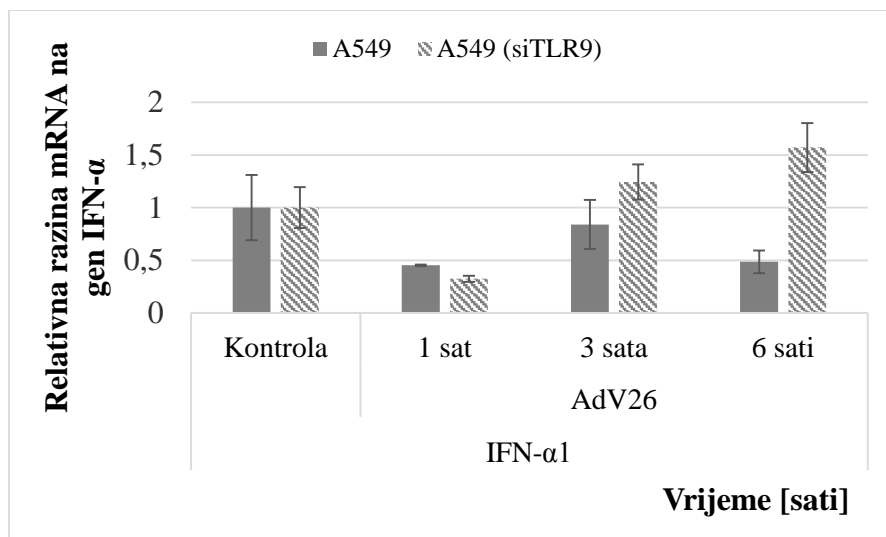
Iz literature je poznato da oslobađanje AdV5 iz endosoma makrofaga potiče ekspresiju i IL-1β i aktivaciju inflammasoma te da su oba ova procesa posredovana TLR9 (Barlan i sur.,

2011). Rezultati dobiveni u ovom radu upućuju da infekcija epitelnih stanica AdV26 također potiče ekspresiju IL-1 $\beta$  koja je ovisna o TLR9. Ekspresija IL-18 nakon infekcije stanica adenovirusom do sada nije bila povezana sa TLR9.

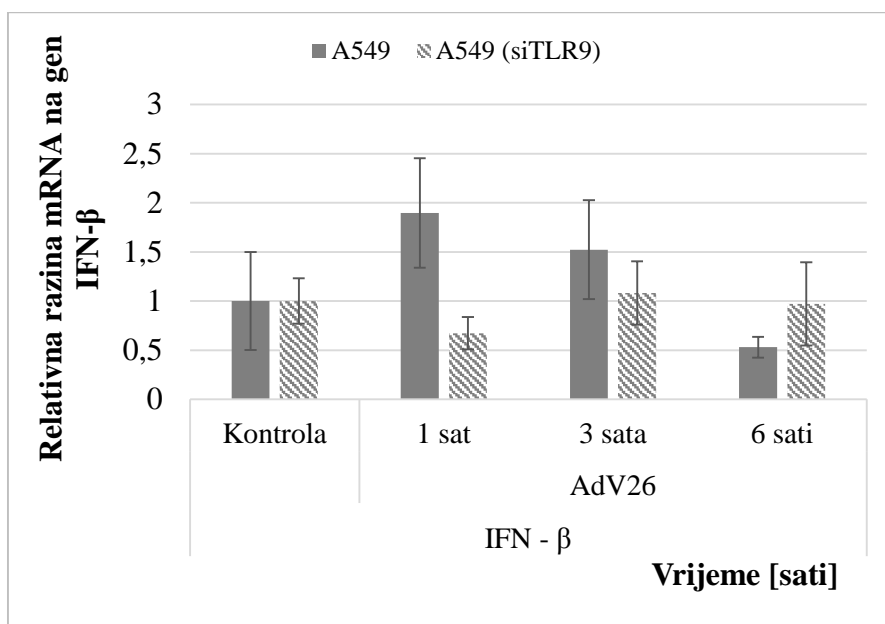
#### 4.4.3. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodiraju za IFN- $\alpha$ 1 i IFN- $\beta$

Jedan od odgovora stanice na infekciju patogenom je i lučenje interferona (IFN). Ukoliko je stanica inficirana virusom, doći će do sinteze IFN tipa I. Povećana razina ekspresije IFN I dovodi do indukcije stanja u kojem se aktiviraju antiviralne komponente, koje sprječavaju replikaciju virusne DNA (Nazir i sur., 2005; Chen i Lee, 2013). Budući da IFN imaju značajnu ulogu prilikom infekcije stanice adenovirusima, proučavana je razina ekspresije IFN- $\alpha$ 1 i IFN- $\beta$ . Kao kontrolne stanice, koristile su se A549 stanice s utišanim i neutišanim TLR9, koje nisu inficirane s AdV26. Ekspresija gena mjerena je u uzorcima koji su sakupljeni 1, 3 i 6 sati nakon infekcije. Rezultati relativne ekspresije gena za IFN- $\alpha$ 1 i IFN- $\beta$  u kontrolnim A549 stanicama i stanicama s utišanim TLR9 nakon infekcije s AdV26 su prikazani na slici 16.

A.



B.



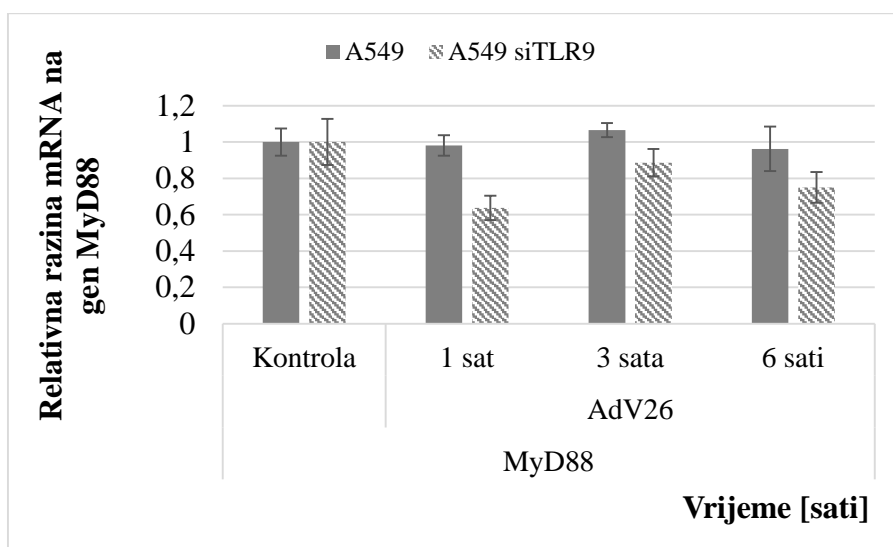
Slika 16. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju mRNA analiziran metodom Real Time RT-PCR na gene IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ . A549 stanice nasađene su u pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću), a nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane AdV26 (MOI:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Uzorci su prikupljeni 1 sat, 3 sata i 6 sati nakon infekcije, odvajanjem stanica od podloge tripsinom i centrifugiranjem (10 minuta pri 1100 x g). Praćena je razina ekspresije mRNA na gene IFN- $\alpha$  (A) i IFN- $\beta$  (B). Rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549 stanice koje nisu inficirane s AdV26. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

Iz rezultata je vidljivo povećanje razine ekspresije IFN- $\beta$  u prvom satu infekcije, koje je u korelaciji s vrijednostima istraživanja Nazir i sur. (2005). No, vrijednosti za IFN- $\alpha$  se smanjuju nakon infekcije, u usporedbi sa stanicama koje nisu inficirane AdV26. Smanjene vrijednosti IFN- $\alpha$  nakon infekcije uočene su i u istraživanju Kemper i sur (2001). Istraživanje je provedeno na majmunima, dok su detektirane vrijednosti u miševima bile znatno više. Ovi rezultati pokazuju važnost istraživanja profila urođenog imunskog odgovora potaknutog Ad vektorima, te ukazuju na smanjenu prezentaciju staničnog receptora CD46 koji AdV26 koristi za infekciju PBMC (Teigler, 2014; Kemper i sur., 2001).

Zhu i sur. (2007) su pokazali da ekspresija IFN- $\alpha$ 1 može biti TLR9 ovisna i neovisna, ovisno o ispitivanim stanicama. Ekspresija IFN- $\alpha$ 1 u A549 stanicama mjerena u ovom radu nakon infekcije AdV26 nije ovisna o TLR9. Za razliku od AdV5 za koji je pokazano da potiče ekspresiju IFN- $\alpha$  u dendritičnim stanicama (Huarte i sur., 2006) AdV26 ne potiče ekspresiju u A549 stanicama (slika 15 A). Infekcija A549 stanica s AdV26 povećava ekspresiju IFN- $\beta$  no samo 2 puta u odnosu na kontrolne neinficirane stanice (slika 15 B).

#### 4.4.4. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju gena koji kodira za MyD88

Osim proučavanja ekspresije mRNA gena uključenih u urođeni imunski odgovor (IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$ ) u radu je proučavana i razina ekspresije mRNA gena koji kodira za protein mijeloidne diferencijacije 88 (*MyD88*). Protein MyD88 sudjeluje u aktivaciji transkripcije NF- $\kappa$ B, kao adaptor molekula, a aktivacija ovisi o vezanju određenih antigena na TLR9 receptore. Rezultati razine ekspresije mRNA za MyD88 su prikazani na slici 17.



**Slika 17. Utjecaj utišavanja TLR9 na ekspresiju mRNA analiziran metodom Real Time RT-PCR na gen koji kodira za protein mijeloidne diferencijacije 88 (*MyD88*).** A549 stanice nasadene su u pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću), a nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane s AdV26 (MOI:  $10^4$  virusnih čestiva/stanici). Uzorci su prikupljeni 1 sat, 3 sata i 6 sati nakon infekcije, odvajanjem stanica od podloge tripsinom i centrifugiranjem (10 minuta pri 1100 x g). Praćena je razina ekspresije mRNA na gen MyD88. Rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549

stanice koje nisu inficirane s AdV26 vektorom. Pokus je ponovljen najmanje 3 puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

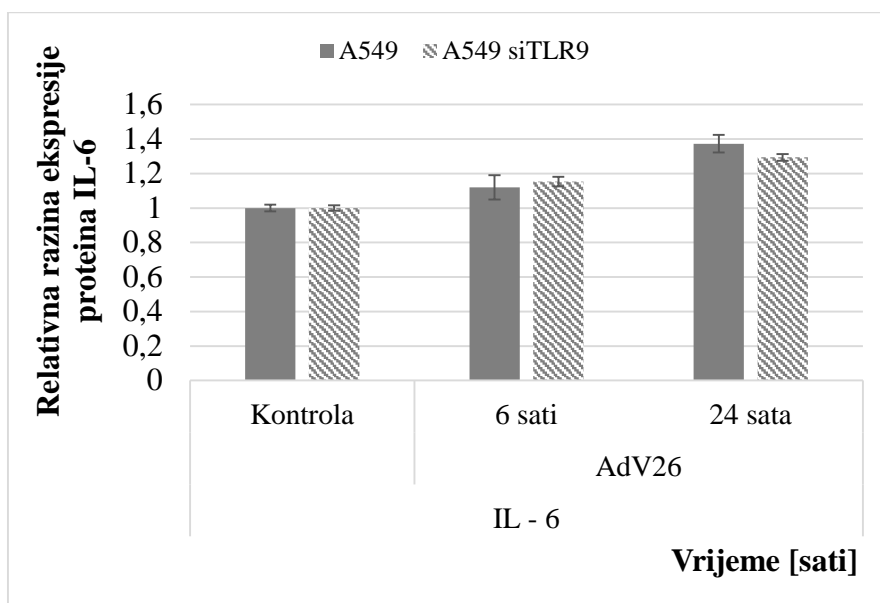
TLR molekule koriste različite signalne puteve kako bi potaknuli lučenje proupalnih citokina i kemokina, pri čemu koriste adaptor molekule u svrhu okidanja određenog signalnog puta. Većina PRR koriste MyD88 kao adaptor protein, a kao rezultat dolazi do proizvodnje proupalnih molekula (Akira i sur., 2006).

Iz rezultata dobivenih u ovom radu vidi se da je razina mRNA na gen MyD88 nakon infekcije AdV26 neznatno promijenjena u A549 stanicama s neutišanim TLR9, ali se vidi smanjenje razine ekspresije u A549 stanicama sa utišanim TLR9 proteinom (slika 16). Istraživanje s MyD88<sup>-/-</sup> dendritičkim stanicama dovelo je do prekinute proizvodnje IFN- $\alpha$  nakon infekcije adenovirusom te je utvrđeno da se prepoznavanje adenovirusa odvija u endosomu od strane TLR9, nakon čega se signal prenosi na MyD88 te se okida signalni put proizvodnje IFN- $\alpha$  (O'Neill i sur., 2009). U ovom radu nije uočena korelacija između ekspresije MyD88 i IFN- $\alpha$ 1, međutim za pouzdaniji zaključak potrebno je dodatno istraživanje.

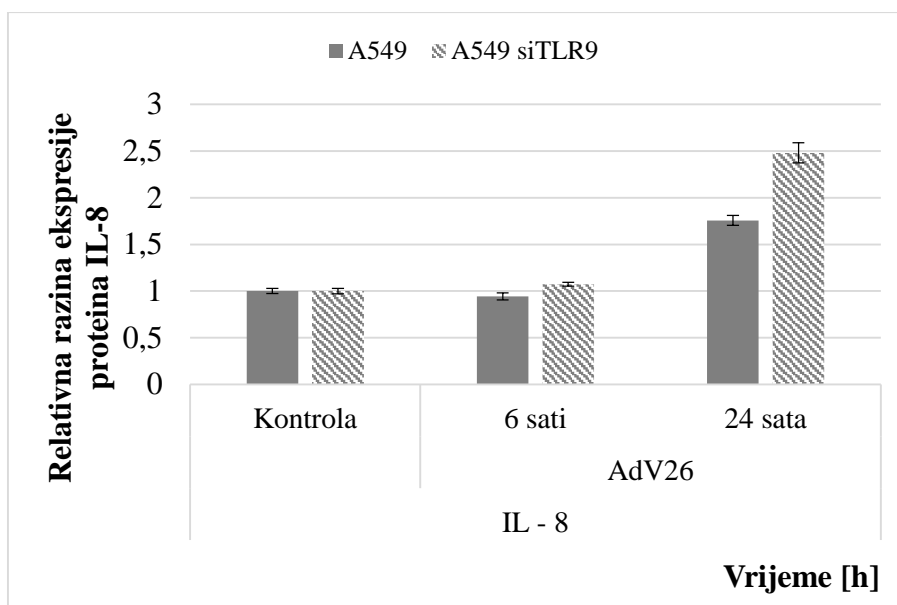
#### **4.5. UTJECAJ UTIŠAVANJA TLR9 NA LUČENJE IL-6 I IL-8 U SUPERNATANT INFICIRANIH STANICA**

Iz rezultata analize mRNA metodom qPCR na gene koji sudjeluju u imunosnom odgovoru stanice, vidljiva je razlika u ekspresiji gena za IL-6 i IL-8 između inficiranih i kontrolnih stanica, te između A549 stanica s utišanim i neutišanim TLR9. Proteini IL-6 i IL-8 luče se iz stanica pa je iz tog razloga metodom ELISA proučavana izlučenih proteina IL-6 i IL-8. Rezultati količine izlučenih IL-6 i IL-8 su prikazani na slici 18.

A.



B.



Slika 18. Usporedba količine izlučenih proteina IL-6 i IL-8 nakon infekcije s AdV26 u A549 stanicama sa i bez utišavanja TLR9. A549 stanice nasadene su u pločice s 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću), a nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane AdV26 (MOI:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Supernatant (1,5 mL) je sakupljen 6 sati i 24 sata nakon infekcije te je praćena količina izlučenih proteina IL-6 (A) i IL-8 (B) ELISA testom. Rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549

stanice koje nisu inficirane AdV26 vektorom. Pokus je ponovljen najmanje 2 puta, a prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

Nakon što su A549 stanice inficirane AdV26, iz supernatanta su metodom ELISA detektirane razine izlučenih proteina IL-6 i IL-8. U 6. satu nakon infekcije su dobivene povećane vrijednosti ovih proteina, a u 24. satu još veće. Vrijednosti su uspoređivane u odnosu na A549 stanice koje nisu inficirane AdV26. Mjerenje razine ekspresije mRNA gena IL-6 i IL-8 je također pokazalo povećanu ekspresiju, ali značajno veću u odnosu na vrijednosti razine ekspresije proteina dobivene metodom ELISA. Teglei i sur. (2012) su u radu utvrdili da je nakon vakcinacije majmuna AdV26 vektorom došlo do povećanja lučenja citokina i kemokina u serumu. Mjerenja su provedena ELISA testom, a mjereni proteini su bili IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IP-10 i proteina I-TAC. Osim vakcinacije s AdV26, istraživanje je provedeno i s AdV5, pri čemu su dobivene vrijednosti za analizirane proteine bile znatno niže (Teigler, 2014).

Iz rezultata se vidi i razlika u razini ekspresije između stanica s utišanim i neutišanim TLR9. Za IL-6, vrijednosti su malo povećane u stanicama s utišanim TLR9 nakon 6 sati infekcije, a nakon 24 sata infekcije, vidi se veća razlika u ekspresiji IL-6 u stanicama u kojima TLR9 nije utišan. U slučaju IL-8, vrijednosti su puno veće u stanicama s utišanim TLR9, kako u 6. satu, tako i u 24. satu nakon infekcije.

Mjerenje razine ekspresije mRNA gena IL-6 i IL-8 nije napravljeno u 24. satu. No, u 6. satu se vidi promjena u fenotipu ekspresije, odnosno dolazi do povećane ekspresije u stanicama s utišanim TLR9, dok je za mjerenja u 1. satu i 3. satu ekspresija bila povećana u stanicama u kojima TLR9 nije utišan. ELISA testom se također vidi povećanje razine ekspresije ovih proteina u stanicama s utišanim TLR9, u odnosu na stanice u kojima TLR9 nije utišan. U 24. satu, taj trend se nastavlja za IL-8, no u slučaju IL-6, vrijednosti su veće u stanicama u kojima TLR9 nije utišan. Razlog povećanog lučenja IL-8 u stanicama s utišanim TLR9 proteinom, nakon 6. i 24. sata infekcije, te IL-6 u 6. satu infekcije, može biti aktivacija drugog signalnog puta, neovisnog o TLR9.

S obzirom da je u ovom radu primjećena povećana ekspresija i u slučaju IL-1 $\beta$ , pokušano je također odrediti i količinu izlučenog proteina IL-1 $\beta$ . ELISA testom IL-1 $\beta$  nije detektiran u supernatantima A549 stanica kao ni supernatantima nakon infekcije s AdV26.



Za izlučivanje proteina IL-1 $\beta$  potrebna je aktivacija kaspaze-1 koja cijepa pro-IL-1 $\beta$  u aktivnu formu IL-1 $\beta$  koja se izlučuje iz stanice (Keller i sur., 2007). Detekcijom kaspaze-1 western blot analizom uočeno je prisustvo samo pro-kaspaze-1, inaktivne forme proteina, te je moguće pretpostaviti da u A549 stanicama do izlučivanja IL-1 $\beta$  ne dolazi zbog nedostatka aktivne forme kaspaze-1. Pro-kaspaza-1 je uočena nakon razdvajanja proteina SDS-elektroforezom te bojanjem amido-crno otopinom. Specifična vrpca za pro-kaspazu-1 je nakon bojanja normalizirana prema tubulinu, a rezultati su prikazani u prilogu 1 (Slika 23.). Iz dobivenih vrijednosti se može uočiti mala promjena u ekspresiji proteina pro-kaspaza-1 nakon infekcije AdV26, pri čemu je u stanicama s utišanim TLR9 prisutno značajnije smanjenje u razini ekspresije u odnosu na stanice u kojima TLR9 nije utišan.

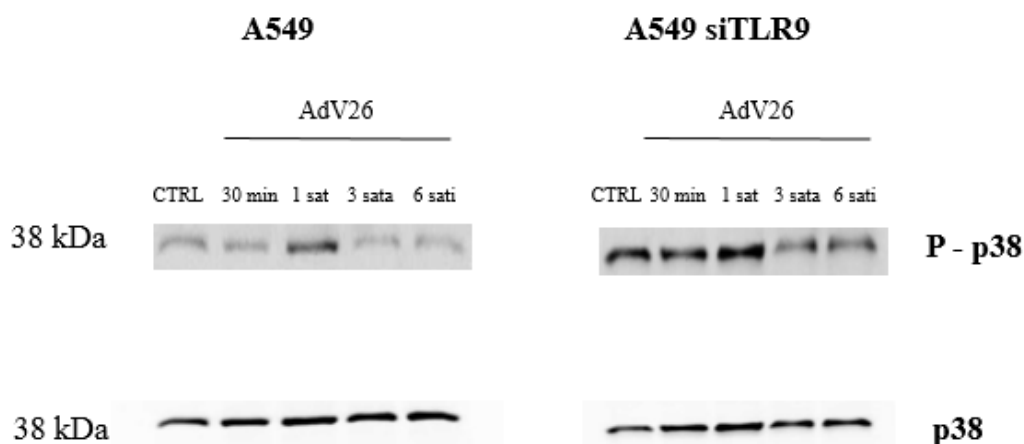
#### **4.6. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA KOJI SUDJELUJU U AKTIVACIJI GENA UKLJUČENIH U IMUNOSNI ODGOVOR**

Nakon identifikacije promjena u razine ekspresije mRNA i proteina koji sudjeluju u imunom odgovoru stanice nakon infekcije s AdV26, uslijedilo je istraživanje proteina koji sudjeluju u aktivaciji transkripcije proučavanih gena, i to u A549 stanicama s utišanim i neutišanim TLR9, odnosno nakon infekcije tih stanica s AdV26.

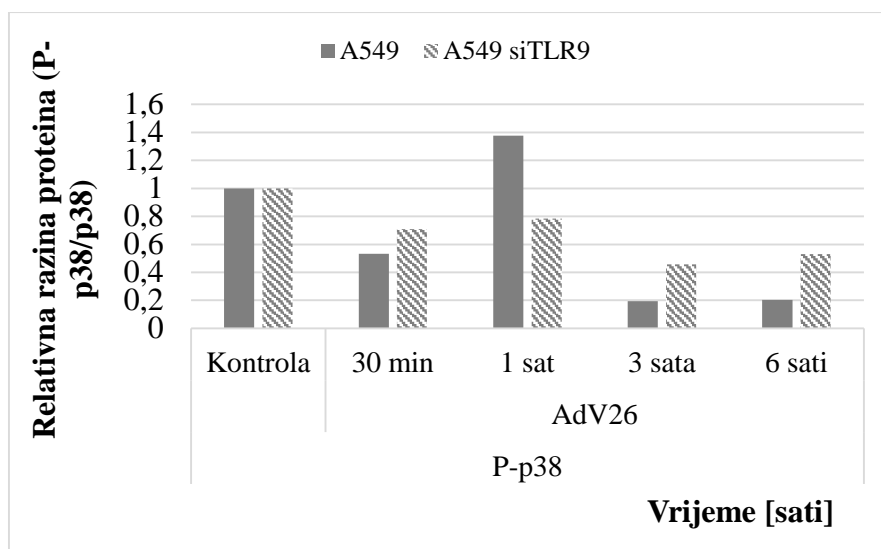
Iz literature je poznato da infekcija adenovirusom potiče nekoliko signalnih putova koji mogu sudjelovati u aktivaciji proteina imunskog sustava. Tako je pokazano da je lučenje IL-8 u epitelnim stanicama pluća nakon infekcije s AdV7 posredovano Ras/Raf/MEK/Erk signalnim putem (Alcorn i sur., 2001), dok u lučenje IL-8 u stanicama rožnice nakon infekcije s AdV19 sudjeluje p38 (MAP kinaza) (Rajaiya i sur., 2008). Inhibicija fosforilacije ERK i p38 smanjila je ekspresiju IP-10 nakon infekcije AdV5 (Tibbles i sur. 2002) ukazujući na važnost ovih signalnih molekula u poticanju imunskog odgovora posredovanog adenovirusima.

U ovom radu odredili smo ekspresiju proteina p38 odnosno njegovu fosforiliranu formu P-p38 i fosforiliranu formu proteina ERK, P-ERK, budući da su navedeni proteini aktivirani kada su fosforilirani. Rezultati ekspresije P-p38 izražene prema ukupnom p38 prikazani su na slici 19. Rezultati ekspresije P-ERK izražene prema ukupnom ERK prikazani su na slici 20.

A.

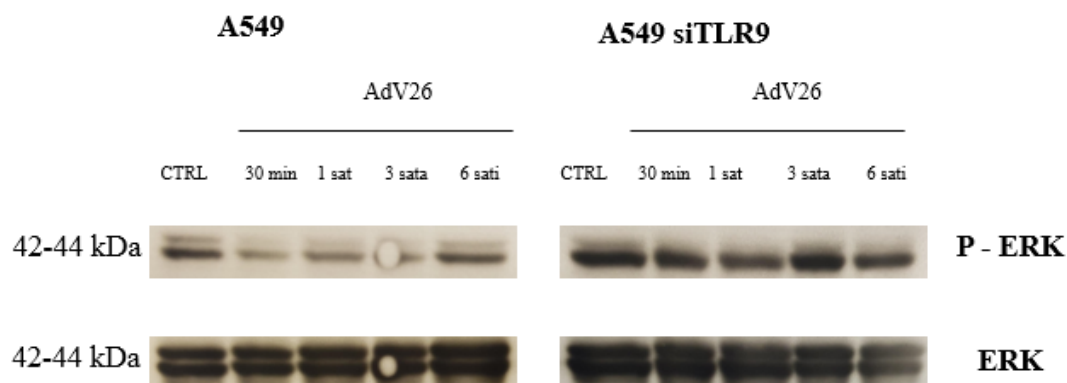


B.

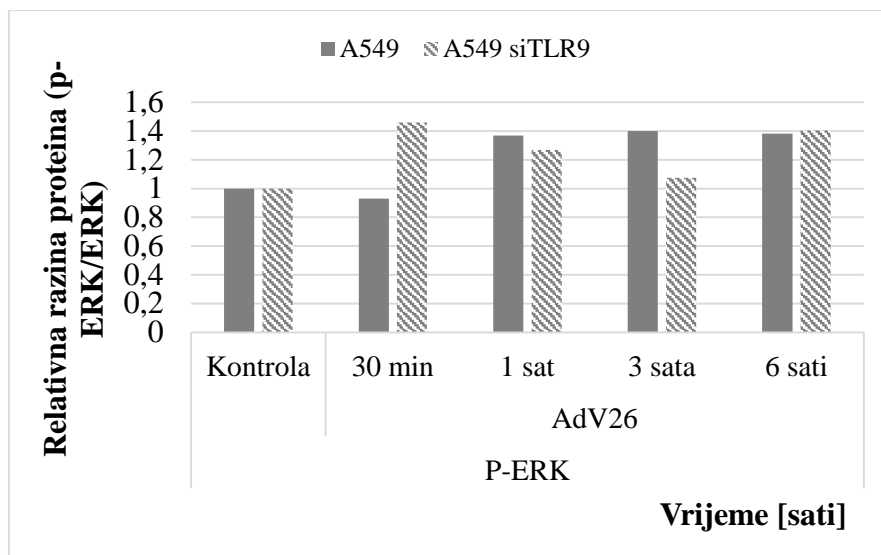


Slika 19. Ekspresija proteina P-p38 nakon infekcije s AdV26 u A549 stanicama sa i bez utišavanja TLR9 detektirana western blot analizom. A549 stanice nasadene su u pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću). Nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane AdV26 (MOI:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Uzorci su sakupljeni metodom vrućeg pufera nakon 30 minuta, 1 sat, 3 sata i 6 sati nakon infekcije. Slika A predstavlja specifične vrpce u utišanim i neutišanim stanicama za protein P-p38, kao i ukupni p38 veličine 38 kDa. Na slici B su prikazane vrijednosti za P-p38 normalizirane prema ukupnom proteinu p38, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549 stanice koje nisu inficirane s AdV26.

A.



B.



Slika 20. Ekspresija proteina P-ERK nakon infekcije s AdV26 u A549 stanicama sa i bez utišavanja TLR9 detektirana western blot analizom. A549 stanice nasadene su u 2 pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću). Nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane AdV26 (moi:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Uzorci su prikupljeni metodom vrućeg pufera nakon 30 minuta, 1 sata, 3 sata i 6 sati nakon infekcije. Slika A predstavlja specifične vrpce u utišanim i neutišanim stanicama za protein P-ERK, kao i ukupni ERK protein, a dobivene su dvije vrpce veličine između 44 kDa i 42 kDa. Na slici B su prikazane vrijednosti za P-ERK normalizirane prema ukupnom proteinu ERK, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549 stanice koje nisu inficirane s AdV26.

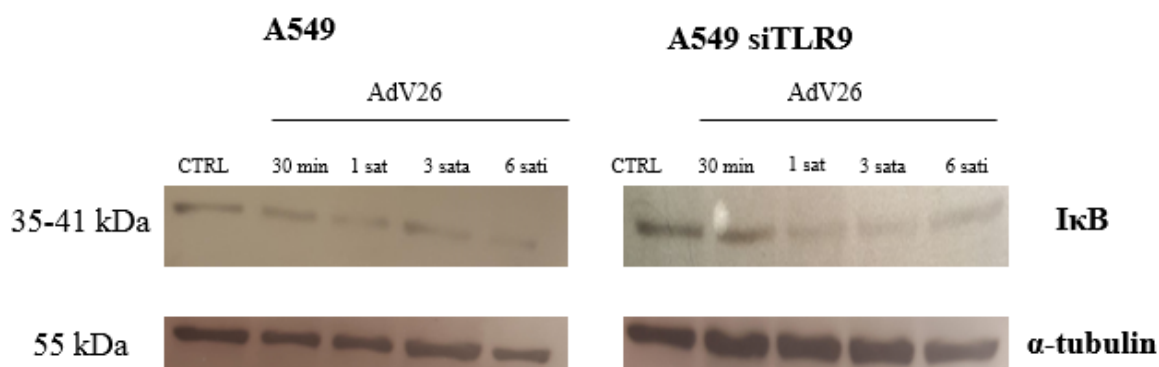
Nakon AdV26 infekcije kontrolnih A549 stanica i A549 stanica s utišanim TLR9, vidljive su promjene u razini ekspresije proteina P-p38 i P-ERK, pri čemu se u kontrolnim stanicama nakon infekcije razina ekspresije proteina P-p38 smanjuje nakon svakog mjerenja (30 minuta, 1h, 3h i 6h), osim u 1. satu nakon infekcije. Vrijednosti za P-ERK se kod stanica s utišanim TLR9 povećavaju, dok se vrijednosti u stanicama u kojima TLR9 nije utišan smanjuju.

Adenoviralni vektori AdV5 aktiviraju ERK i p38 signalne putove nakon ulaska u stanicu (Tibbles i sur., 2012), a u stanicama plućnog epitela nakon adenoviralne infekcije se također aktivira ERK, te posljedično dolazi do lučenja IL-8. Osim toga, infekcija AdV7 u goveđem i humanom plućnom tkivu stimulira aktivaciju proteina ERK (Booth i sur., 2004). Rezultati razine ekspresije ERK proteina su u korelaciji s dosadašnjim istraživanjima samo u slučaju A549 stanica s utišanim TLR9. Na osnovu rezultata dobivenih u ovom radu moguće je pretpostaviti da se u epitelnim A549 stanicama ERK protein aktivira u slučaju smanjene razine ekspresije TLR9 te dolazi do potrebe za poticanjem lučenja antiviralnih molekula alternativnim signalnim putem. U slučaju kada TLR9 nije utišan, signalni put aktivacije transkripcije citokina i kemokina se ne odvija pomoću ERK molekule nakon vezanja AdV26, što je različito u odnosu na dosad objavljene podatke za AdV5, AdV7 i AdV19.

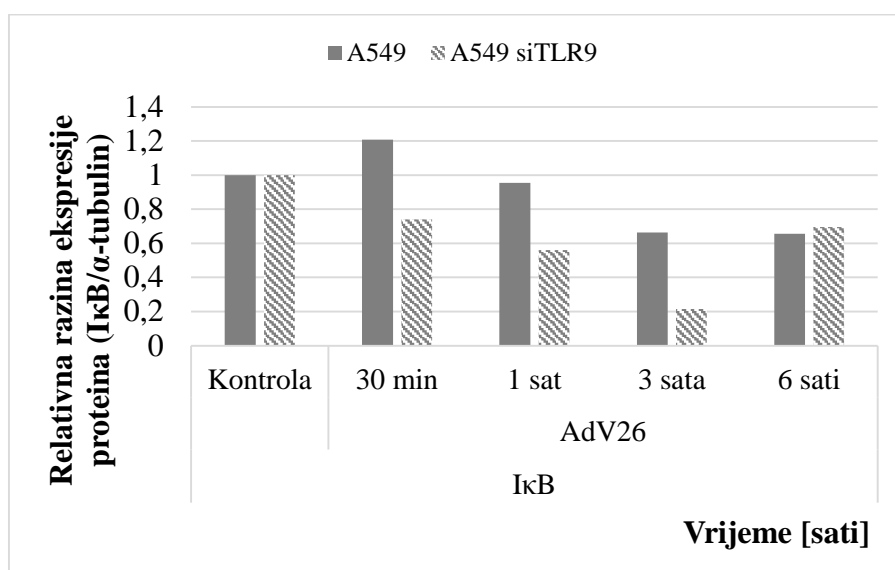
Protein P-p38 se aktivira u 1. satu nakon infekcije u kontrolnim A549 stanicama, no nakon toga se razina ekspresije P-p38 smanjuje. U A549 stanicama s utišanim TLR9 proteinom ne dolazi do fosforilacije, odnosno aktivacije, P-p38 proteina. Iz toga slijedi da je za aktivaciju P-p38 nakon infekcije AdV26 potreban TLR9 protein.

Osim p38 i ERK, istraživana je razina ekspresije proteina I $\kappa$ B, koji djeluje kao represor aktivatora transkripcije gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru stanice, NF- $\kappa$ B. Rezultati razine proteina I $\kappa$ B su prikazani na slici 21.

A.



B.



Slika 21. **Ekspresija proteina IκB nakon infekcije s AdV26 u A549 stanicama sa i bez utišavanja TLR9 detektirana western blot analizom.** A549 stanice nasadene su u 2 pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću). Nakon 24 sata, stanice u 6 bunarića su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane AdV26 (moi:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Uzorci su prikupljeni metodom vrućeg pufera nakon 30 minuta, 1 sata, 3 sata i 6 sati nakon infekcije. Slika pod A predstavlja specifične vrpce u utišanim i neutišanim stanicama za protein IκB, veličine između 35 i 41 kDa te protein α-tubulin, veličine 55 kDa. Na slici pod B su prikazane vrijednosti za IκB normalizirane prema proteinu α-tubulin, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549 stanice koje nisu inficirane s AdV26.

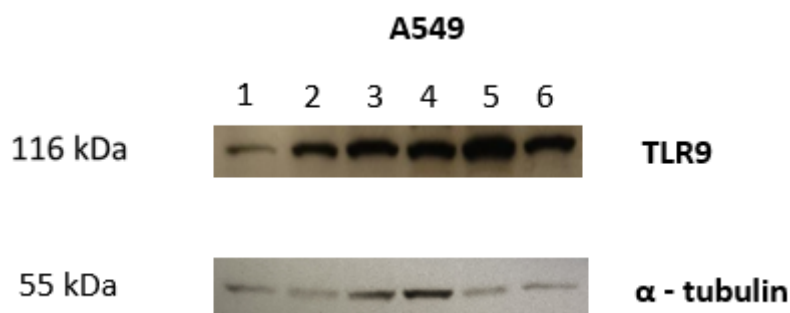
Smanjenje razine I $\kappa$ B se smatra da je povezana s aktivacijom NF- $\kappa$ B. U istraživanjima Iacobelli i Nemerow (2007) aktivaciju NF- $\kappa$ B utvrđena je kvantifikacijom razine ekspresije proteina I $\kappa$ B proteina. Nefosforiliran I $\kappa$ B zadržava NF- $\kappa$ B u citoplazmi, a kad se fosforilira, odvaja se te degradira u proteasomu, što rezultira translokacijom slobodnog NF- $\kappa$ B u jezgru.

Nakon adenovirusne infekcije endotelih plućnih stanica u *in vitro* uvjetima, došlo je do aktivacije NF- $\kappa$ B, koji je aktivirao transkripciju IL-8 (Keicho i sur., 1997, Keicho i sur., 1999). Iz rezultata ovog rada, vidi se smanjenje ekspresije I $\kappa$ B, nakon 1. sata infekcije, 3. i 6. sata u kontrolnim A549 stanicama, dok se u stanicama s utišanim TLR9 smanjenje vidi već nakon 30 minuta. Iz toga se može zaključiti kako se I $\kappa$ B fosforilira te dolazi do njegove degradacije. To omogućava proteinu NF- $\kappa$ B da se translocira u jezgru te aktivira citokine i kemokine, kao odgovor na infekciju AdV26. Iako do smanjenja razine ekspresije I $\kappa$ B, odnosno aktivacije NF- $\kappa$ B, dolazi kako u kontrolnim, tako i u stanicama s utišanim TLR9, vidljiva je razlika u vremenskoj dinamici razine ekspresije I $\kappa$ B u kontrolnim u odnosu na stanice s utišanim TLR9. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da nedostatak TLR9 omogućava bržu aktivaciju NF- $\kappa$ B signalnog puta nakon infekcije A549 stanica s AdV26.

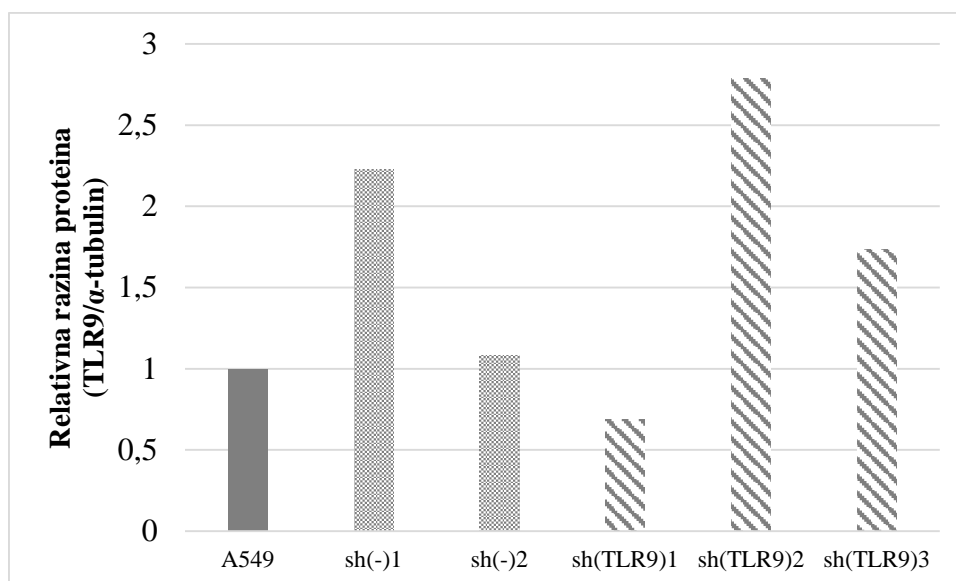
#### **4.7. STABILNA TRANSFEKCIJA A549 STANICA PLAZMIDOM KOJI SADRŽI sh(TLR9) I IZDVAJANJE KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM TLR9**

U svrhu dobivanja klonova koji stabilno ekspimiraju smanjenu količinu TLR9 proteina, provedena je metoda transfekcije te izdvajanje stabilno transficiranih staničnih linija. U ovom radu su korištena dva plazmida: kontrolni plazmid sa sh(-) i plazmid koji kodira za sh(TLR9). Nakon transfekcije, uslijedilo je izdvajanje stabilnih klonova. Budući da plazmid koji se koristio za transfekciju ima gen za otpornost na antibiotik geneticin, stanice su uzgajane u mediju s geneticin, te su narasle samo oni klonovi koji su stekli otpornost zahvaljujući stabilnoj ugradnji plazmida. Na kraju je uspješnost transfekcije provjerena western blot analizom na protein TLR9, a rezultati su prikazani na slici 22.

A.



B.



Slika 22. **Razina ekspresije proteina TLR9 u A549 klonovima dobivenima stabilnom transfekcijom plazmida koji kodiraju za sh(-) ili sh(TLR9) detektirana western analizom.** A549 stanice nasadene su u pločice sa 6 bunarića ( $10^4$  stanica po bunariću). Pripremljena smjesa plazmidne DNA (sh(-), odnosno sh(TLR9)) nakapana je na stanice. U svrhu odabira klonova stabilno transficiranim plazmidom koji u sebi sadrži odabrani gen, u hranjivu podlogu je dodan genetski selekcijski agens (600  $\mu$ g/mL). Pojedinačne kolonije izdvojene su struganjem sterilnim plastičnim nastavkom za mikropipetu i prenesene u bunariće pločice sa 96 bunarića u koje je prethodno dodana hranjiva podloga DMEM-FBS sa genetskim selekcijskim agensom. Nakon što je dostignut dovoljan broj stanica za analizu, uspješnost transfekcije je provjerena western blot analizom. Na slici A se nalaze specifične vrpce za protein TLR9, veličine 116 kDa i  $\alpha$ -tubulin, veličine 55 kDa. 1 – A549 stanice; 2 – A549 klon 1. sa sh(-); 3. A549 klon 2. sa sh(-); 4. A549 klon 1. sa sh(TLR9); 5. A549 klon 2. sa sh(TLR9); 6. A549 klon 3. sa sh(TLR9). Na slici B su prikazane vrijednosti za TLR9 normalizirane

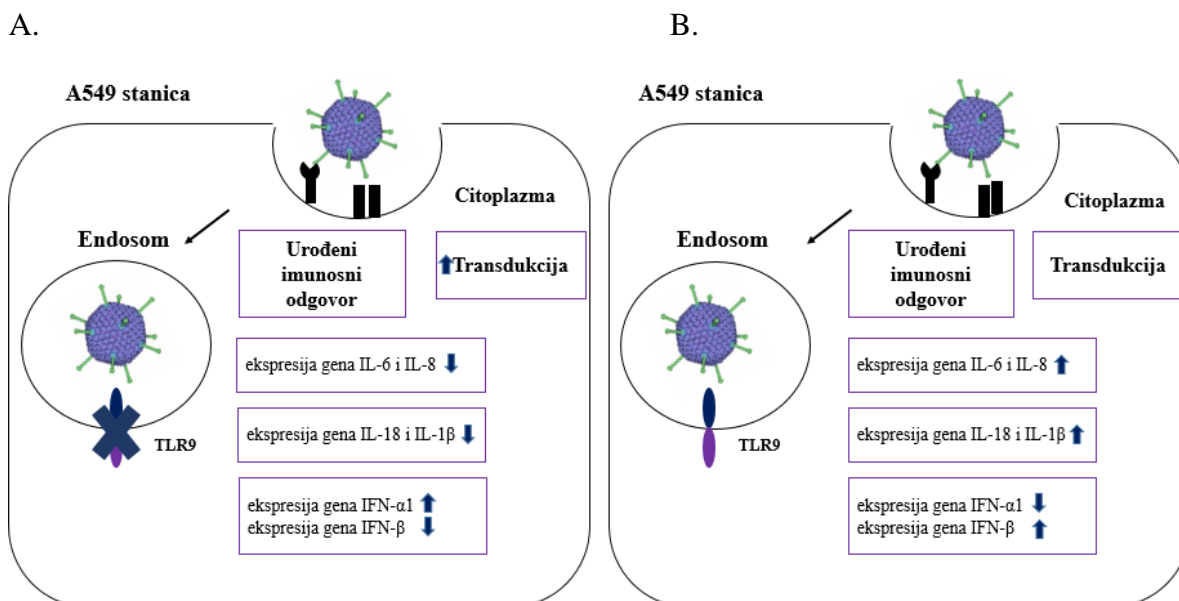
prema proteinu  $\alpha$ -tubulin1, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na neutišane A549 stanice.

Nakon transfekcije i izvdajanja stabilno transficiranih staničnih linija, provedena je analiza uspješnost transfekcije metodom western blot. Analiza je provedena na 2 klona s ugrađenom sh(-) te na 3 klona s ugrađenom sh(TLR9). Na slici 21 vidi se da klon sh(-)1 ima veću ekspresiju TLR9 nego kontrolne stanice te taj klon nije uzet u obzir. Klon sh(-)2 pokazuje ekspresiju TLR9 sličnu onoj u kontrolnim stanicama te je klon sh(-)2 odabran kao negativna kontrola za nastavak istraživanja. U odnosu na klon sh(-)2 samo klon sh(TLR9)1 pokazuje smanjenu ekspresiju TLR9 te je isti odabran kao klon za daljnje analize. Istraživanje na odabranim klonovima nastavit će se u budućnosti.

Rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju kako AdV26 nakon ulaska u stanice A549 potiče urođeni imunosni odgovor. U radu je istraživana uloga TLR9, koji kao receptor imunosnog sustava može prepoznati AdV26. U tu svrhu je stanicama utišan TLR9, te se proučavala razina ekspresije gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru stanice nakon infekcije s AdV26. Nakon infekcije, u stanicama sa smanjenom ekspresijom TLR9 je za većinu gena potaknuti imunosni odgovor bio manji, u odnosu na stanice kojima TLR9 nije bio utišan. Kada TLR9 prepozna AdV26, dolazi do aktivacije signalnih molekula, poput P-p38, P-ERK i NF- $\kappa$ B (Medzhitov i Janeway, 1997; Kumari sur., 2009). Proteini p38 i ERK su nakon fosforilacije u aktivnom obliku (Liu i Muruve, 2003), a protein NF- $\kappa$ B je aktivan kada je u slobodnom obliku, a inaktivan kada je vezan za I $\kappa$ B (Iacobelli i Nemerow, 2007). Nakon fosforilacije, I $\kappa$ B se razgrađuje, a NF- $\kappa$ B je nakon toga u slobodnom obliku. Infekcijom i aktivacijom signalnih molekula dolazi do poticanja brojnih kemokina i citokina (Hartman i sur., 2007).

Iz rezultata se također vidi kako AdV26 bolje inficira stanice u kojima je ekspresija TLR9 smanjena, dok je infekcija neutišanih stanica znatno niža (Slika 23.).





Slika 23. **Shematski prikaz rezultata** nakon ulaska AdV26 u A549 stanice, sa utišanim TLR9 proteinom (A) i bez utišanog TLR9 proteina (B).

TLR9 protein prepoznaje dsDNA. Iako je dosadašnjim istraživanjima utvrđeno kako TLR9 sudjeluje u prepoznavanju adenovirusa (Kawai i Akira, 2010), uloga TLR9 u prepoznavanju AdV26 nije poznata. AdV26 je potencijalni vektor za prijenos gena i vakcinaciju zbog niske koncentracije neutralizacijskih protutijela u ljudi u odnosu na AdV5 (Nwanegbo i sur., 2004; Kostense i sur., 2004; Shiver i Emini, 2004; Sumida i sur., 2005). Iako se puno istraživanja provodi u svrhu primjene AdV26, kaskada reakcija aktivirana ulaskom AdV26 nije istražena. Iz tog razloga, identifikacija molekula koje sudjeluju u urođenom imunosnom odgovoru potaknutom AdV26, kao i detekcija molekula uključenih u aktivaciju transkripcije gena koje sudjeuju u imunosnom odgovoru, su od velikog značaja.

## 5. ZAKLJUČCI

1. AdV26 bolje inficira stanice u kojima je ekspresija TLR9 smanjena, u odnosu na stanice kojima TLR9 nije utišan.
2. AdV26 nakon ulaska u A549 stanice potiče urođeni imunosni odgovor, pri čemu dolazi do sinteze citokina i kemokina (IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$ ). Imunosni odgovor stanica sa smanjenom ekspresijom TLR9 je za većinu gena manji (IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ ), u odnosu na stanice kojima TLR9 nije utišan.
3. Protein P-ERK sudjeluje kao signalna molekula nakon infekcije AdV26 u stanicama s utišanim TLR9 proteinom, a protein P-p38 u stanicama u kojima TLR9 nije utišan. Razina ekspresije proteina I $\kappa$ B se smanjuje nakon infekcije adenoviralnim vektorom tipa 26 te se time aktivira transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B.

## **6. LITERATURA**

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

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124**, 783-801.

Alcorn, M., J., Booth, J., L., Coggeshall, K., M., Metcalf, J., P. (2001) Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *J Virol.***75**, 6450–6459.

Appledorn, D., M., Patial, S. McBride, A., Godbehere S., Rooijen, N., V., Parameswaran, N., Amalfitano, A. (2008) Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol.* **181**, 2142-2144.

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

Barlan, A., U., Griffin, T., M., Mcguire, K., A., Wiethoff, C., M. (2011). Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome. *J. Virol.* **85**, 146–155.

Barouch, D., H., Kik, S., V., Weverling, G., J., Dilan, R., Sharon L. King, S., L., Maxfield, L., F., Clark, S., Ng'ang'a, D., Brandariz, K., L., Abbink, P., Sinangil, F., de Bruyn, G., Gray, G., E., Roux, S., Bekker, L., G., Dilraj, A., Kibuuka, H., Robb, M., L., Michael, N., L., Omu Anzala, O., Amornkul, P., N., Gilmour, J., Hural, J., Buchbinder, S., P., Seaman, M., S., Dolin., R., Baden, L., R., Carville, A., Mansfield, K., G., Maria G. Pau, M., G.,

Goudsmit, J. (2011) International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine*. **29**, 4-5.

Brenner, S., H. Miller, J., H. (2001) Encyclopedia of Genetics, 1. izd., academic press, Molecular Sciences Institute Inc, Berkeley, str. 15-17.

Booth, J., L., Coggeshall, K., M., Gordon, B., E., Metcalf, J., P. (2004) Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. *J Virol*. **78**, 4156–64.

Booth, J., L., Metcalf, J., P. (1999) Type-specific induction of interleukin-8 by adenovirus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **21**, 521–527.

Booth, J., L., Coggeshall, K., M., Gordon, B., E., Metcalf, J., P. (2004) Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. *J Virol*. **78**, 4160-62.

Borgland, S., L., Bowen, G., P., Wong, N., C., W., Libermann, T., A., Muruvr, D., A. (2000) Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-KB. *J. Virol*. **74**, 3945-3946.

Bruder J., T., Kovesdi I. (1997) Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression. *J Virol*. **71**, 398–404.

Cerullo, V., Seiler, M., P., Mane, V., Brunetti-Pierri, N., Clarke, C., Bertin, T., K., Rodgers, J., R., Lee, B. (2007) Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther*. **15**, 379.

Chen, R., F., Lee, C., Y. (2013) Adenoviruses types, cell receptors and local innate cytokines in adenovirus infection. *Intl Immunol.* **33**, 5. doi: 10.3109/08830185.2013.823420

Coughlan, L., Alba, R., Parker, A., L., Bradshaw, A., C., McNeish, I., A., Nicklin, S., A., Baker, A., H. (2010) Tropism-Modification Strategies for Targeted Gene Delivery Using Adenoviral Vectors. *Viruses.* **2**, 2293.

Cruse, J., M., Lewis, R., E. (1999) Cytokines. in: atlas of immunology, 3. izd., CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, str 185–206.

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

Fejer, G., Freudenberg, M., Greber, U.F., Gyory, I. (2011) Adenovirus-triggered innate signalling pathways. *Eur J Immunol.* **4**, 281-284.

Geisbert, T., W., Bailey, M., Hensley, L., Asiedu, C., Geisbert, J., Stanley, D., Honko, A., Johnson, J., Mulangu, S., Pau, M., G., Custers, J., Vellinga, J., Hendriks, J., Jahrling, P., Roederer, M., Goudsmit, J., Koup, R., Sullivan, N., J. (2011) Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J Virol.* **85**, 4223.

Greber U., F., Suomalainen M., Stidwill R., P., Boucke K., Ebersold M., Helenius A. (1997) The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* **16**, 5998–6007.

Guggemoos, S., Hangel, D., Hamm, S., Heit, A., Bauer, S., Adler, H. (2008) TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *J. Immunol.* **180**, 438–443.

Hartman, Z., C., Kiang, A., Everett, R., S., Serra, D., Xiao Y. Yang, X., Y., Clay, T., M., Amalfitano, A. (2007) Adenovirus infection triggers a rapid, MyD88-regulated transcriptome response critical to acute-phase and adaptive immune responses in Vivo. *J Virol.* **81**, 1810-1811.

Hendrickx, R., Stichling, N., Koelen, J., Kuryk, L., Lipiec, A., Greber U., F. (2014) Innate immunity to adenovirus. *Hum Gene Ther.* **25**, 275-276.

Hensley, S., E., Amalfitano, A. (2007) Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors. *Mol Ther.* **15**, 1417-1418.

Huang, G., H., Xu, W., B. (2013) Recent advance in new types of human adenovirus. *Bing Du Xue Bao.* **29**, 342–348.

Huarte, E., Larrea, E., Hernández-Alcoceba, R., Alfaro, C., Murillo, O., Arina, A., Tirapu, I., Azpilicueta, A., Hervás-Stubbs, S., Bortolanza, S., Pérez-Gracia, J., L., Civeira, M., P., Prieto, J., Riezu-Boj, J., I., Melero, I. (2006) Recombinant adenoviral vectors turn on the type I interferon system without inhibition of transgene expression and viral replication. **14**, 130-136. doi <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.02.015>

Iacobelli-Martinez, M., Nemerow, G., R. (2007) Preferential activation of toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses. *J Virol.* **81**, 1309-1311.

Kalin, S., Amstutz, B., Gastaldelli, M., i sur. (2010) Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *J. Virol.* **84**, 5336–5350.

Kawai, T., Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol.* **11**, 377.



Keicho, N., Elliott, W., M., Hogg, J., C., Hayashi, S. (1997) Adenovirus E1A upregulates interleukin-8 expression induced by endotoxin in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol.* **272**, 1046–52.

Keicho, N., Higashimoto, Y., Bondy, G., P., et al. (1999) Endotoxin-specific NF-kappaB activation in pulmonary epithelial cells harboring adenovirus E1A. *Am J Physiol.* **277**, 523–32.

Keller, M., Ruegg, A., Werner, S., Beer, H., D. (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* **132**, 818-819. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.040

Kemper, C., Leung, M., Stephensen, C., B., Pinkert, C., Liszewski, M., K., Cattaneo, R., Atkinson, J., P. (2001). Membrane cofactor protein (MCP; CD46) expression in transgenic mice. *Clin. Exp. Immunol.* **124**, 180–189.

Kostense, S., Koudstaal, W., Sprangers, M., Weverling, G., Penders, J., Helmus, G., N., Vogels, R., Bakker, M., Berkhout, B., Havenga, M., Goudsmit, J. (2004). Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. *Aids* **18**, 1213–1216.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* **420**, 2, 4, 7-8, 10-11.

Li, E., Stupack, D., Bokoch, G., M., Nemerow, G., R. (1998) Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol.* **72**, 8806–8812.

Li, E., Brown, S., L., Stupack, D., G., Puente, X., S., Cheresch, D., A., Nemerow, G., R. (2001) Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J Virol.* **75**, 5405–5409.

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

Life science (2013) <https://yshassanblog.wordpress.com/2013/01/06/inflammasomes/>.  
Pristupljeno 27. lipnja 2018.

Lion, T. (2014) Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* **27**, 442-443.

Liu, Q., Muruve, D. (2003) Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* **10**, 938.

Lopez-Castejon, G., Brough, D. (2011) Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *CYTOKINE growth F R.* **22**, 189-190. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001

Lynch, J., P., Fishbein, M., Marcela Echavarria, M. (2011) Adenoviruses. *Am J Respir Crit Care Med.* **32**, 494-511. doi: [org/10.1055/s-0031-1283287](http://org/10.1055/s-0031-1283287). ISSN 1069-3424. str 495.

Majhen, D., Calderon, H., Chandra, N., Fajardo, C., A., Rajan, A., Alemany, R., Custers, J. (2014) Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field. *Hum Gene Ther.* **25**, 301.

Maude Pauly, M., Hoppe, E., Mugisha, L., Petrzalkova, K., Akoua-Koff, C., Couacy-Hymann, E., Anoh, A., E., Mossoun, A., Grit Schubert, G., Wiersma, L., Pascale, S., Muyembe, J. J., Karhemere, S., Weiss, S., Leendertz, S., A., Calvignac-Spencer, S., Leendertz, F., H., Ehlers, B. (2014) High prevalence and diversity of species D adenoviruses (HAdV-D) in human populations of four Sub-Saharan countries. *Virol J.* **12**, 2.

Medzhitov, R., Janeway, C., A. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* **9**, 4.

Mistchenko, A., S., Diez, R., A., Mariani, A., L., et al. (1994) Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J Pediatr.* **124**, 714–20.

Natarajan, K., Rajala M., S., Chodosh, J. (2003) Corneal IL-8 expression following adenovirus infection is mediated by c-Src activation in human corneal fibroblasts. *J Immunol.* **170**, 6234-6243; 6236-6241. doi: 10.4049/jimmunol.170.12.6234, <http://www.jimmunol.org/content/170/12/6234>.

Nazir, S., A., Metcalf, J., P. (2005) Innate immune response to adenovirus. *J Investig Med.* **53**, 292–304.

Nwanegbo, E., Vardas, E., Gao, W., Whittle, Sun, H., Rowe, D., Robbins, P., D., Gambotto, A.. (2004) Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin Diagn Lab Immunol.* **11**, 351–357.

O’neill, L., A., J., Bryant, C., E., Doyle, S., L. (2009) Therapeutic targeting of toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev.* **61**, 177-97.

Perez, L., Carrasco, L. (1994) Involvement of the vacuolar H(+)-ATPase in animal virus entry. *J Gen Virol.* **75**, 2595-606.

Rockland (2016) <<https://rockland-inc.com/ELISA-Kits.aspx>>. Pristupljeno 21. lipnja 2018.

Ryu, W. S. (2017) *Molecular virology of human pathogenic viruses*, 1. izd, Elsevier/AP, Amsterdam, str. 111-124.

Schleimer, R. P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D., Avila, P., C. (2009) Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses. *ATS Journals*. **6**, 288-289.

Shiver, J., Emini, W. E., A. (2004). Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu. Rev. Med.* **55**, 355–372.

Shutterstock. Preuzeto sa <<https://www.shutterstock.com/image-vector/adenovirus-morphology-adenoviruses-most-commonly-cause-160235651>>. Pristupljeno 27. lipnja 2018.

Sumida, S. M., Truitt, D. M., Lemckert, A. A., Vogels, R., Custers, J. H., Addo, M. M., Lockman, S., Peter, T., Peyerl, F. W., Kishko, M. G., Jackson, S. S., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Essex, M., Walker, B. D., Goudsmit, J., Havenga, M. J., Barouch. D., H. (2005) Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J. Immunol.* **174**, 7179–7185.

Teigler, J. E., Iampietro, M. J., Barouch, D., H. (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.

Teigler, J. E., Kagan, J., C., Barouch, D., H. (2014) Late endosomal trafficking of alternative augments antiviral innate immunity serotype adenovirus vaccine vectors. *J. Virol.* **88**, 10344, 10358, 10360-10362.

Teigler, J. E. (2014). Differential innate immune stimulation elicited by adenovirus and poxvirus vaccine vectors. *J Virol.* **6**, 42-44, 57-58. doi:10.1128/JVI.00740-12

The Journal of Gene Medicine (2017) <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>.  
Pristupljeno 20. lipnja 2018.

Tibbles, L., A., Spurrell, J., C., L., Bowen, G., P., Liu, Q., Lam, M., Zaiss, A., K., Robbins, S., M., Hollenberg, M., D., Wickham, T., J., Muruve, D., A. (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**, 1562-1566.

Trujillo, G., Meneghin, A., Flaherty, K., R., Sholl, L., M., Jeffrey L. Myers, J., L., Kazerooni, E., A., Gross, B., H., Oak, S., R., Coelho, A., L., Holly Evanoff, H., Day, E., Toews, G., B., Joshi, A., D., Schaller, M., A., Waters, B., Jarai, G., Westwick, J., Kunkel, S., L., Martinez, F., J., Hogaboam, C., M. (2010) TLR9 differentiates rapidly from slowly progressing forms of idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Transl Med.* **2**, 5-6.

Vetrini, F., Philip Ng . P. (2010) Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current advances and future perspectives. *Viruses.* **2**, 1888.

Wold, S., M., W., Tollefson, A., E. (2007) Adenoviruses methods and protocols, 2. izdanje, Humana press, Totowa, str. 285-287.

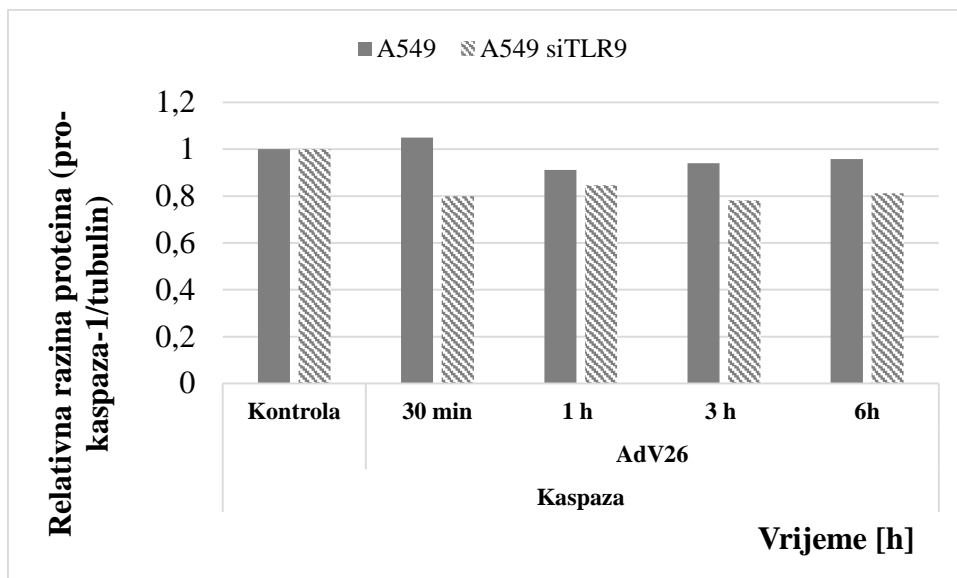
Zhang, P., Summer, W., R., Bagby, G., J., Nelson, S. (2000) Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* **173**, 39–51.

Zhao, X. (2011) The innate immune response induced by adenovirus, adenoviral vectors and other viruses (Doctoral dissertation). Preuzeto sa Advanced Virology, VTMC 833. 9-10.

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**, 3172-3179.

Zsengelle'r, Z., Otake, K., Hossain, S., A., Berclaz, P., Y., Trapnell, B., C. (2000) Internalization of Adenovirus by Alveolar Macrophages Initiates Early Proinflammatory Signaling during Acute Respiratory Tract Infection. *J Virol.* **74**, 9655-67, 2000.

## **7. PRILOZI**



Slika 24. Ekspresija proteina pro-kaspaze-1 nakon infekcije s AdV26 u A549 stanicama sa i bez utišavanja TLR9 detektirana western analizom. A549 stanice nasadene su u pločice sa 6 bunarića ( $5 \times 10^4$  stanica po bunariću). Nakon 24 sata, stanice su utišane sa siRNA specifičnom za TLR9. 72 sata poslije utišavanja, utišane i neutišane A549 stanice su inficirane AdV26 (MOI:  $10^4$  virusnih čestica/stanici). Uzorci su sakupljeni metodom vrućeg pufera nakon 30 minuta, 1 sat, 3 sata i 6 sati nakon infekcije. Na slici su prikazane vrijednosti za pro-kaspazu-1 normalizirane prema proteinu tubulinu, a rezultati su prikazani relativno u odnosu na utišane i neutišane A549 stanice koje nisu inficirane s AdV26.