

Uloga klatrina u infekciji adenovirusnim vektorima tipa 5, 26 i 35

Lindić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:844386>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2021.

Petra Lindić

1038/MB

**ULOGA KLATRINA U INFEKCIJI
ADENOVIRUSNIM VEKTORIMA
TIPA 5, 26 I 35**

Rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, voditeljstvom dr. sc. Dragomire Majhen te dr. sc. Davora Nestića i dr. sc. Ksenije Božinović koji su pri izradi diplomskog rada bili neposredni voditelji.

Rad je izrađen u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta „Razumijevanje puta ulaska Adenovirusa tipa 26 u stanicu: način poboljšanja vektora za vakcinaciju“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem dr. sc. Dragomiri Majhen na nesebičnom pomaganju, na mnogim savjetima, ohrabrivanjima, neizmjerne podršci, komunikaciji te osjećaju sigurnosti koji mi je pružila tijekom izrade diplomskog rada. Bez nje ovaj rad nebi bio izvediv i veliko joj hvala na tome.

Zahvaljujem dr. sc. Andreji Ambriović Ristov na danoj prilici izrade diplomskog rada na Institutu Ruđer Bošković te na potpori i ohrabrivanju.

Zahvaljujem dr. sc. Davoru Nestiću i dr. sc. Kseniji Božinović na stalnoj pomoći u laboratoriju i uvijek ugodnoj i veseloj atmosferi.

Zahvaljujem svojim roditeljima i sestri koji su bili uz mene tijekom cijelog mog školovanja, prolazili i proživljavali samnom sve lijepe, ali i teške trenutke. Bez njih ovo nebi bilo ostvarivo.

I također zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji i najboljim prijateljima što su uvijek bili tu za mene, u bilo koje doba dana i noći.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Laboratorij za biologiju i mikrobnu genetiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ULOGA KLATRINA U INFEKCIJI ADENOVIRUSNIM VEKTORIMA TIPA 5, 26 I 35

Petra Lindić, 1038/MB

Sažetak: Adenovirusni vektori imaju potencijalno translacijsku i komercijalnu vrijednost, a trenutno se istražuju kao vektori za prijenos nukleinskih kiselina i vakcinaciju. Adenovirusni vektor najčešće korišten u kliničkim istraživanjima je adenovirus tip 5 (AdV5) koji je do sada ujedino i najbolje istražen adenovirus. Prema literaturnim podacima, poznato je da je klatrin uključen u endocitozu AdV5 te smo u ovom radu smanjenjem ekspresije klatrina željeli ispitati da li istu ili sličnu ulogu klatrin ima i u uspješnosti transdukcije adenovirusa tip 26 (AdV26) i adenovirusa tip 35 (AdV35), dva niskoseroprevalentna adenovirusa koji su se pokazali kao obećavajući kandidat za razvoj novih vektorskih vakcina. Klatrin je utišan u A549 stanicama te je nakon određivanja uspješnosti transdukcije adenovirusa, pokazano da smanjenjem količine klatrina dolazi do smanjenja uspješnosti transdukcije s AdV5 i povećanja uspješnosti transdukcije s AdV26. Smanjenje ekspresije klatrina nije imalo značajniji utjecaj na uspješnost transdukcije s AdV35. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na važnost klatrinom posredovane endocitoze u uspješnosti transdukcije AdV26 što do sada nije bilo poznato iz literature.

Ključne riječi: klatrin, endocitoza, AdV5, AdV26, AdV35

Rad sadrži: 43 stranice, 14 slika, 9 tablica, 55 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: dr. sc. Dragomira Majhen, viš. znan. sur. IRB, dr. sc. Davor Nestić i dr. sc. Ksenija Božinović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević, PBF
2. Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znan. savj. IRB
3. Dr. sc. Dragomira Majhen, viš. znan. sur. IRB
4. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac, PBF (zamjena)

Datum obrane: 20. siječnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ROLE OF CLATRIN EXPRESSION IN INFECTION WITH ADENOVIRUS VECTORS

TYPE 5, 26 AND 35

Petra Lindić, 1038/MB

Abstract: Adenovirus based vectors have potential translational and commercial values and are currently studied as vectors for DNA transfer and vaccination. The adenovirus vector most commonly used in clinical trials is adenovirus type 5 (AdV5) which is by far the best researched adenovirus. According to the literature, it is known that clathrin is involved in AdV5 endocytosis, and in this study we wanted to examine whether clathrin plays the same or similar role in the success of adenovirus type 26 (AdV26) and adenovirus type 35 (AdV35) transduction efficiency, two low seroprevalent adenoviruses which proved to be very promising as a vector vaccine. Clathrin was silenced in A549 cells and after determining the success of adenovirus transduction, it was shown that decreasing the amount of clathrin leads to a decreased transduction efficiency with AdV5 and increased transduction efficiency with AdV26. Decreased clathrin expression did not have a significant effect on the transduction efficiency with AdV35. The results obtained in this study indicate the importance of clathrin-mediated endocytosis in the success of AdV26 transduction, which has not been known from the literature so far.

Keywords: clathrin, endocytosis, AdV5, AdV26, AdV35

Thesis contains: 43 pages, 14 figures, 9 tables, 55 references

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: PhD. Andreja Ambriović Ristov, Senior scientist IRB, Assistant professor PBF

Technical support and assistance: : PhD. Dragomira Majhen, Senior research associate, IRB, PhD. Davor Nestić and PhD. Ksenija Božinović

Reviewers:

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

Thesis defended: 20th of January 2021

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. REPLIKACIJSKI CIKLUS ADENOVIRUSA..... | 4 |
| 2.2. INFEKCIJSKI PUT ADENOVIRUSA | 5 |
| 2.2.1. Vežanje adenovirusa | 6 |
| 2.2.2. Ulazak adenovirusa u stanicu domaćina | 7 |
| 2.2.3. Bijeg adenovirusa iz endosoma..... | 9 |
| 2.2.4. Unutarstanično putovanje adenovirusa | 9 |
| 2.2.5. Unos adenovirusne DNA u jezgru stanice domaćina..... | 10 |
| 2.3. ADENOVIRUSNI VEKTORI..... | 11 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 13 |
| 3.1. MATERIJALI | 13 |
| 3.1.1. Kemikalije i uređaji..... | 13 |
| 3.2. METODE..... | 16 |
| 3.2.1. Stanična kultura <i>in vitro</i> | 16 |
| 3.2.2. Izdvajanje stabilno utišanih klonova | 16 |
| 3.2.3. MTT test..... | 17 |
| 3.2.4. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa na jastučiću i gradijentu CsCl | 19 |
| 3.2.5. Western blot analiza..... | 19 |
| 3.2.6. Određivanje koncentracije virusnih čestica u suspenziji pročišćenih virusa | 22 |
| 3.2.7. Fluorescentno obilježavanje adenovirusa | 22 |
| 3.2.8. Protočna citometrija – određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusima..... | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 25 |
| 4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOSTI SUPSTANCE MTT TESTOM | 26 |
| 4.2. IZDVAJANJE I KARAKTERIZACIJA A549 KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KLATRINA..... | 27 |
| 4.3. UMNAŽANJE I PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSNIH VEKTORA..... | 32 |
| 4.4. INFEKCIJA A549 KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KLATRINA ADENOVIRUSNIM VEKTORIMA TIPA 5, 26 I 35 | 35 |
| 5. ZAKLJUČCI | 38 |
| 6. LITERATURA | 39 |

1. UVOD

Genska terapija definira se kao prijenos nukleinskih kiselina u somatske stanice s ciljem dobivanja terapijskog učinka, i to ispravljanjem genetičkih nedostataka ili omogućavanjem ekspresije terapijski korisnih proteina (Rubanyi, 2001). U genskoj terapiji tumora koriste se četiri pristupa: imunološka stimulacija, pojačavanje toksičnosti na stanice raka (suicidna genska terapija) i upotreba općih ili specifičnih tumor supresor gena (p53). Vektori namijenjeni genskoj terapiji tumora dizajnirani su tako da izravno ciljaju tumor uz pomoć specifičnog liganda dodanog na kapsidu ili uporabom promotora specifičnih za tumore (Nadeau i Kamen, 2003). Takva terapija započinje ulaskom odgovarajućeg vektora (virusnog, nevirusnog ili na bazi stanica) u tijelo, izravno ubrizgavanjem u tkivo (lokalno) ili u krvotok (Rubanyi, 2001). Najčešće korišteni viralni vektori u kliničkim ispitivanjima su adenovirusni vektori. Prednosti njihovog korištenja su lakoća umnažanja u visokom titru, znatna veličina pakiranja čestica te učinkovito transduciranje stanica koje se dijele i ne dijele (Arnberg, 2012; Kozarsky i Wilson, 1993). Osim u genskoj terapiji, adenovirusni vektori se koriste i u vakcinaciji. Najčešće korišten adenovirusni vektor temeljen je na adenovirusu tipa 5, međutim njegova velika seroprevalencija, odnosno velika količina neutralizacijskih protutijela, ograničava njegovu upotrebu (Abe i sur., 2009; Nadeau i Kamen, 2003). Adenovirusi tipa 26 i 35 pokazuju manju seroprevalenciju u ljudima, što ih čini privlačnim alternativama za razvoj novih vektora (Geisbert i sur., 2011).

Cilj ovog diplomskog rada bio je izdvojiti i okarakterizirati A549 stanice sa stabilno utišanom ekspresijom klatrina te ispitati utjecaj utišavanja klatrina na infekciju adenovirusima tipa 5, 26 i 35.

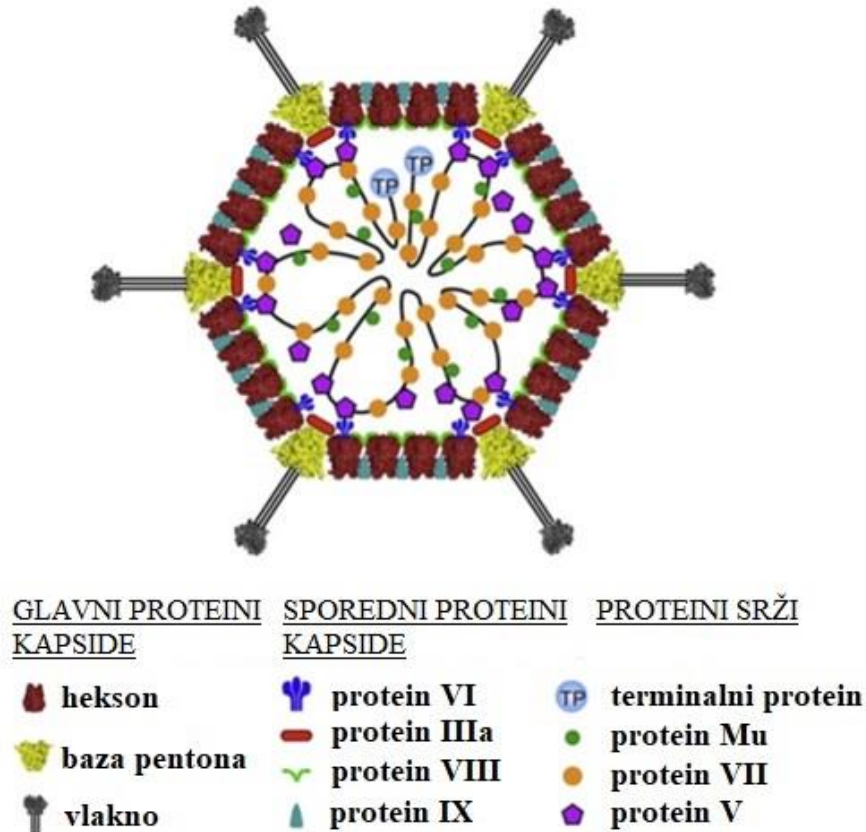
2. TEORIJSKI DIO

Adenovirusi su DNA virusi ikozaedarske kapside bez lipidne ovojnice, promjera od 90 do 100 nm. Genom virusa čini dvolančana molekula DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*), duljine od 35 000 do 37 000 parova baza, ovisno o serotipu virusa (Arnberg, 2012; Nemerow i sur., 2009; Meier i Greber, 2004). Adenovirusi pripadaju rodu *Mastadenovirus* obitelji *Adenoviridae*, koji obuhvaća više od 50 serotipova, svrstanih u 7 grupa označenih od A do G. Povijesno gledano, adenovirusi su uglavnom klasificirani na temelju serologije, njihove onkogenosti u glodavcima i njihove sposobnosti aglutinacije ljudskih i životinjskih crvenih krvnih stanica. Trenutno su također klasificirani na temelju DNA homologije. Ljudski adenovirusi povezani su s bolestima dišnih putova (grupe A – C, E), bolesti očiju (grupe B – E) i crijeva (uglavnom grupa F, ali također i grupe A, C, D, G). Određene vrste također mogu uzrokovati bolesti u mokraćnom sustavu (grupa B), jetri (grupa C) ili tonzilima i/ili adenoidima (grupa C). Adenovirusne infekcije mogu biti asimptomatske, ali mogu biti i smrtonosne, posebno kod osoba s oslabljenim imunitetom (Arnberg, 2012; Gonçalves i Vries, 2006).

Adenovirusi čovjeka (AdV) su prvi put izolirani početkom 1950-tih godina, iz adenoidnog tkiva. AdV su značajno doprinijeli razvoju molekularne biologije eukariota tako što su poslužili kao model za istraživanje za alternativno izrezivanje RNA (Berk, 2016; Gonçalves i Vries, 2006). Što je najbitnije, AdV se široko koriste u molekularnoj biotehnologiji kao vektori za prijenos gena i vektorske vakcine. Međutim, ove primjene su djelomično spriječene imunosnim odgovorom domaćina kojeg izazivaju proteini kapside, ali i poteškoćama u ciljanju određenih vrsta stanica. Iz tog razloga je za vektorsko ciljanje stanica i izmjenu antigenih svojstava virusa, potreban redizajn, temeljen na strukturi, što zahtijeva detaljno poznavanje strukture AdV. Kristalna struktura i rekonstrukcija krioelektronske mikroskopije visoke razlučivosti netaknutog AdV pružili su detaljniji molekularni model strukture i sklopa čestice AdV, međutim još uvijek nedostaje opis potpune i točne zadaće svih proteina kapside (Benevento i sur., 2014; Gonçalves i Vries, 2006).

Adenovirus je građen od proteinske kapside i srži unutar koje se nalazi genom. Postoje 3 glavna proteina (hekson, baza penton i vlakno) te 4 „sporedna“ proteina kapside (IIIa, VI, VIII i IX) (slika 1). Svaki virion sadrži 240 heksonska trimera (heksona) i 12 baza pentona, od kojih je svaki vezan s jednim trimerom vlakna. Heksone i pentone spajaju 3 manja proteina: IX, IIIa i VIII. Na vanjskoj površini kapside nalaze se 240 kopija proteina IX, dok se 60 kopija proteina IIIa i 120 kopija proteina VIII nalaze na unutarnjoj površini kapside (Liu i sur., 2010). Brojne

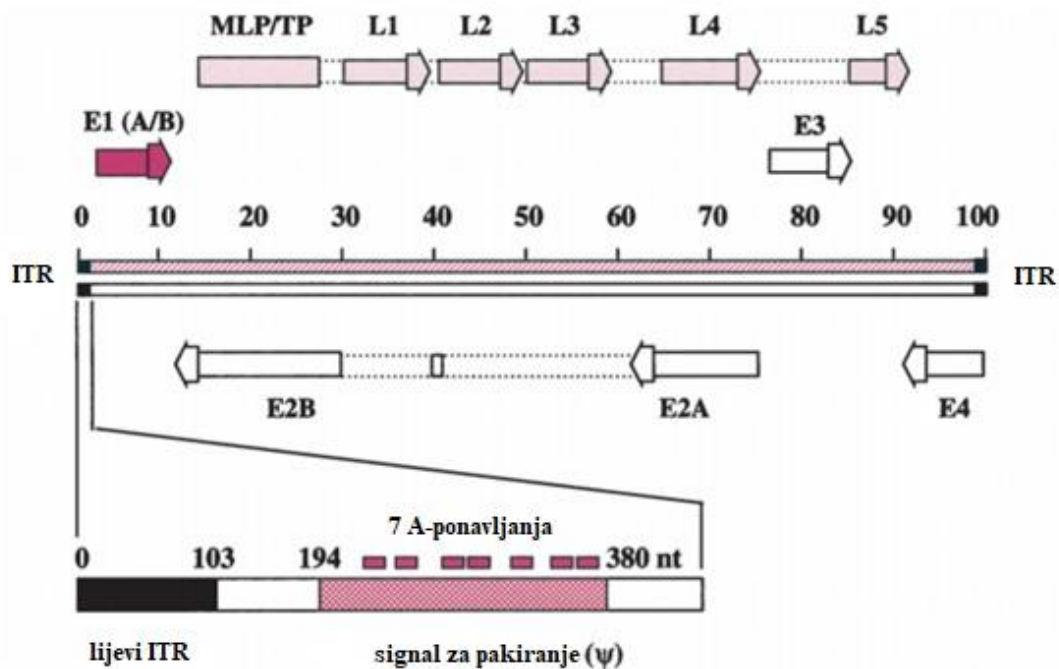
kopije V, VII i Mu proteina usko su povezane s virusnom DNA, koja se nalazi u srži (engl. *Core*) virusa. Prilikom sazrijevanja virusa unutar domaćina, IIIa, VI i VIII proteini, uključujući i proteini VII i Mu, cijepaju se virusnom proteazom. Linearna AdV DNA sadrži terminalni protein kovalentno vezan za svaki od njegovih 5' krajeva, koji je odgovoran za replikaciju DNA (Nemerow i sur., 2009).



Slika 1. Shematski dijagram adenovirusa koji prikazuje jedanaest strukturnih proteina u virionu (Nemerow i sur., 2009)

Postoje dvije faze transkripcije adenovirusa, rana i kasna faza, koje se odvijaju prije i nakon replikacije. Rano transkribirajuće regije su E1, E2, E3 i E4 (slika 2). Produkti E1 gena, uključujući E1A i E1B, uključeni su u replikaciju virusa. E2 proteini pružaju mehanizam za replikaciju virusne DNA i transkripciju kasnih gena. Većina E3 proteina sudjeluje u moduliranju imunskog odgovora zaraženih stanica, a produkti E4 gena sudjeluju u metabolizmu virusne mRNA, potiču replikaciju DNA virusa te zaustavljaju sintezu proteina domaćina.

Glavni receptor za adenoviruse čovjeka je Coxsackie / Adenovirusni receptor (CAR). Kada se virus nađe u stanici, translocira se do kompleksa jezgrine pore, NPC (engl. *nuclear pore complex*), gdje se virusna DNA oslobađa u jezgru. Transkripcija i replikacija odvijaju se u jezgri zaražene stanice (Saha i Parks, 2017; Kremer i Nemerow, 2015; Walters i sur., 2002).

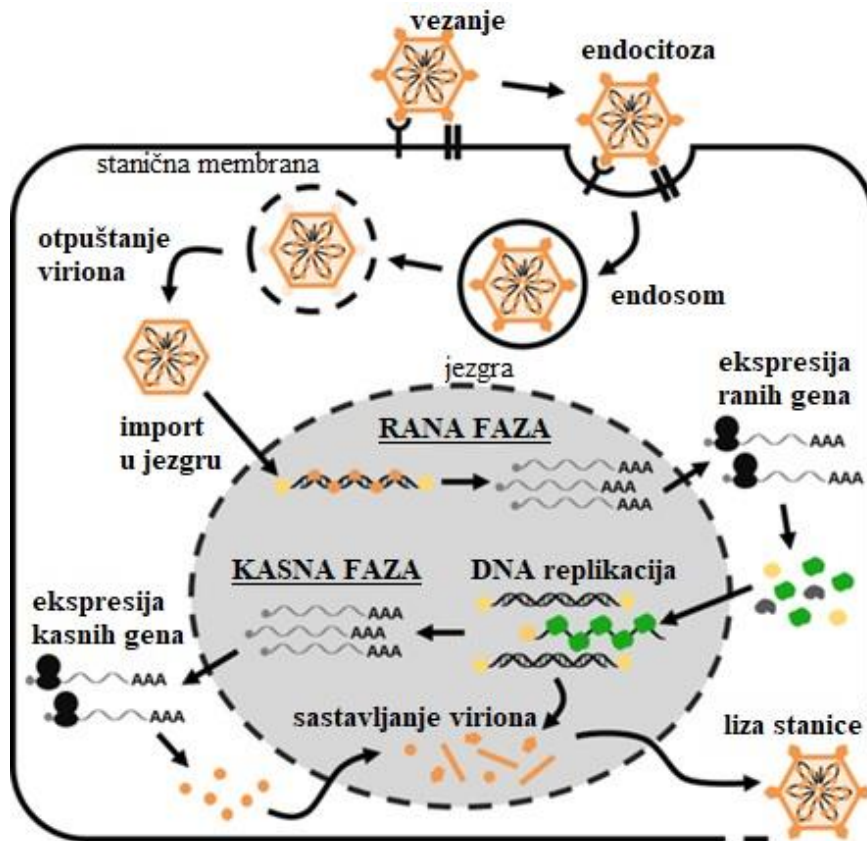


Slika 2. Genom AdV5 i njegovi esencijalni *cis* elementi. Crni kvadratići, koji se nalaze na oba kraja, predstavljaju ITR (engl. *inverted terminal repeat*) sekvence. Tamno ružičasta strelica predstavlja E1, a prazne strelice E2A, E2B, E3 i E4 transkripcijske jedinice. Kasno transkribirajuće regije prikazane su svijetlo ružičastim strelicama. Svijetlo ružičasti pravokutnik predstavlja lokaciju MLP-a (engl. *major late promoter*) i tripartite leader sekvence. Također je prikazan i lijevi *cis* element koji uključuje lijevu ITR sekvencu i signal za pakiranje, koji uključuje A - ponavljanja (Zhang, 1999)

2.1. REPLIKACIJSKI CIKLUS ADENOVIRUSA

Adenovirusi pripadaju skupini litičkih DNA virusa. Njihov replikacijski ciklus započinje ulaskom u stanice i završava otpuštanjem iz liziranih, zaraženih stanica (slika 3). Adenovirusi podskupine C (AdV2 i AdV5) imaju vrlo učinkovit litički ciklus koji rezultira s otprilike 10000 viriona po zaraženoj stanici uključujući i virusne proteine koji su se u višku sintetizirali i DNA koja se nije ugradila u virione. Svaki ciklus traje 32-36 sati, pri čemu rana faza (s ekspresijom

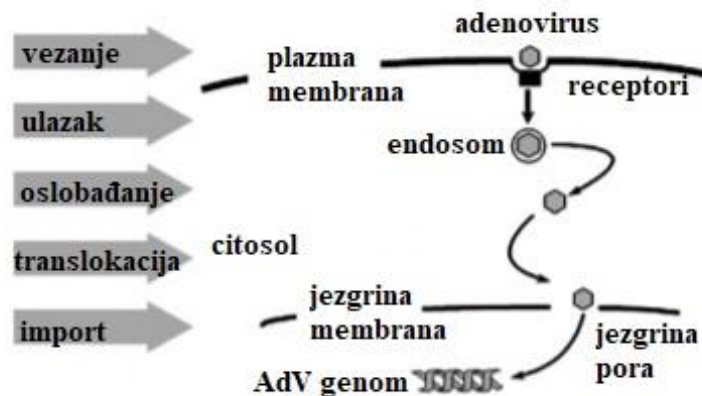
ranih gena) traje prvih 6-9 sati, a kasna faza (replikacija DNA, ekspresija kasnih gena i sastavljanje viriona) ostatak vremena. Kod adenovirusa nije identificiran nikakav mehanizam ugradnje virusnog genoma u genom domaćina (Zhang, 1999).



Slika 3. Litički ciklus adenovirusa (Charman i sur., 2019)

2.2. INFEKCIJSKI PUT ADENOVIRUSA

Klasični infektivni put adenovirusa može biti opisan u 5 faza. To su vezanje na površinu stanice, ulazak u stanicu, oslobađanje iz endosoma, unutarstanično putovanje i unos adenovirusne DNA u jezgru domaćina (slika 4) (Leopold i Crystal, 2007).



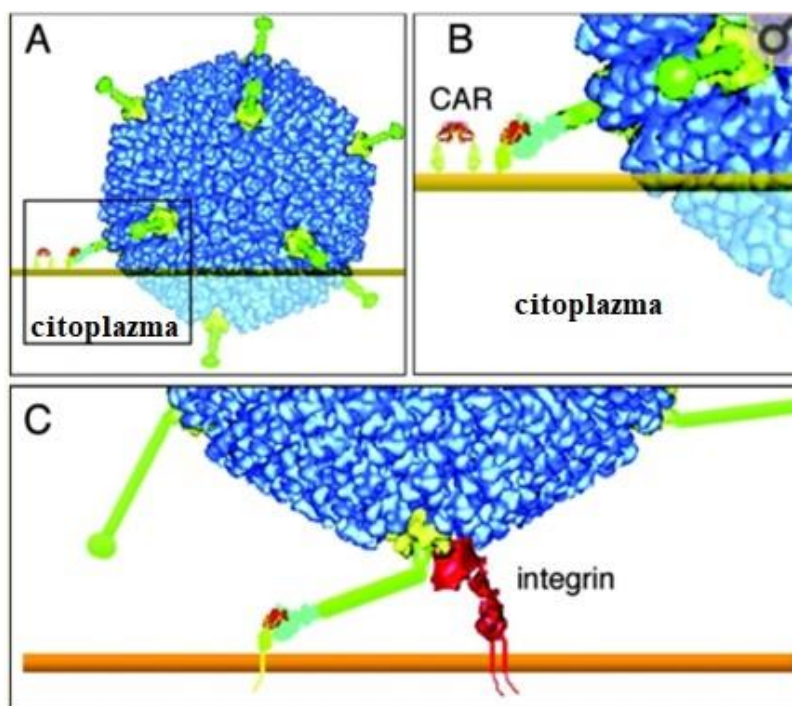
Slika 4. Pet faza infekcijskog puta adenovirusa (Leopold i Crystal, 2007)

2.2.1. Vežanje adenovirusa

Vežanjem adenovirusa za receptore, koji se nalaze na površini stanica, započinje klasični adenovirusni infekcijski put. Prvi korak u vežanju adenovirusa je interakcija između glave adenovirusnog vlakna i primarnog receptora koji se nalazi na površini stanica. Slijedeći korak je sekundarna interakcija nižeg afiniteta koja se odvija između arginin-glicin-aspartat (RGD) domene koja se nalazi u bazi pentona adenovirusa i integrina ($\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha M\beta 2$ i $\alpha 5\beta 1$) koji se nalaze na površini stanica. U kombinaciji, ove interakcije dovode do ireverzibilnih interakcija kapside adenovirusa s površinom stanica (Leopold i Crystal, 2007).

Najbolje proučeni primarni adenovirusni receptor je CAR koji pripada imunoglobulinskoj superobitelji. Veličine je 46 kDa te njegova ekspresija u određenim stanicama omogućuje vežanje virusa koji pripadaju grupi A (AdV12), C (AdV2, AdV5), E (AdV4) ili F (AdV41). Topljivi CAR je u interakciji i s AdV31 (grupa A), AdV9 i AdV19 (grupa D) ili s njihovim izoliranim vlaknima. Također služi kao receptor za nekoliko životinjskih adenovirusa.

Da bi infekcija bila uspješna, virusi koji se vežu na CAR, moraju imati vlakna koja su dugačka i fleksibilna čime je omogućena interakcija s integrinima, što je vidljivo na stukturalnim modelima (slika 5). Međutim, AdV9 se mogu vežati na CAR iako imaju vrlo kratka vlakna jer njihova interakcija sa stanicama ne ovisi o CAR-u nego oni izravno stupaju u interakciju s integrinom, preko baze pentona. Smatra se da slobodna adenovirusna vlakna mogu olakšati širenje virusa zato jer ometaju međustanična vežanja ovisna o CAR-u (Zhang i Bergelson, 2005).

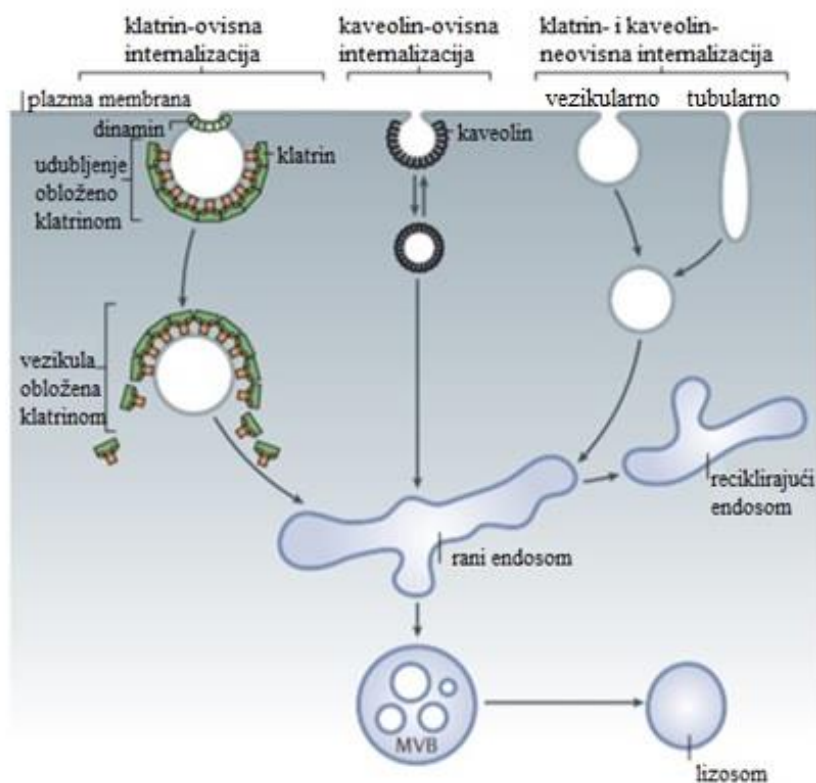


Slika 5. Geometrijska ograničenja u interakciji adenovirusa i receptora. Na slikama A i B, vezanje kratkog vlakna (zeleno) za CAR koji se nalazi na površini stanice, ne dopušta da virus, tj. protein baze pentona ulazi u interakciju s molekulom integrina, koji se također nalazi na površini stanice. Na slici C, virus s dugim fleksibilnim vlaknima može istodobno stupati u interakciju s CAR-om i integrinom (Zhang i Bergelson, 2005)

2.2.2. Ulazak adenovirusa u stanicu domaćina

Jednom kada je adenovirus vezan za površinu stanice, kapsida ulazi u stanicu receptor-posredovanom endocitozom. Ulazak adenovirusa u stanicu najbolje je opisan za AdV5. U ranim ispitivanjima elektronskim mikroskopom utvrđena je vezikula, s debelim slojem elektrona, koja nosi AdV5. Vezikula je kasnije prepoznata kao klatrinom obložena vezikula. Morfološki podaci za ulazak AdV5 putem endocitoze dobiveni su istraživanjima koja su pokazala ko-lokalizaciju kapsida adenovirusa s ostalim ligandima za koje se zna da ulaze u stanice putem endocitoze. Internalizacija virusa zahtjeva prisutnost slobodnog kolesterola u plazma membrani. Uloga endocitoze u ulasku adenovirusa bila je dokazana u sustavu u kojem je klatrinom-posredovan unos bio blokiran korištenjem dominantnog negativnog inhibitora endocitoze. Esencijalnu ulogu u odvajanju klatrinom obložene vezikule od plazma membrane ima protein dinamin. Koristeći mutant dinamina (K44A), koji je dominantno negativni

inhibitor endocitoze, došlo je do smanjenog ulaska adenovirusa u stanice. Sumarno je na taj način pokazano da AdV5 infekcija ovisi o klatrin-posredovanoj endocitozi (Leopold i Crystal, 2007; Wang i sur., 1997). Iako vezikule omotane klatrinom mogu biti formirane i od drugih membranskih odjeljaka, termin klatrinom posredovana endocitoza se koristi da se naznači unos putem vezikula, koje su nastale iz plazme membrana. Klatrinom posredovanu endocitozu koriste sve eukariotske stanice. Osim klatrinom posredovanom endocitozom adenovirusi mogu ući u stanicu i ostalim klatrin-neovisnim putevima poput kaveolin-ovisnim putem, međutim u puno manjoj mjeri i samo u nekim vrstama stanica. Molekularni detalji korištenja klatrin-neovisnih puteva za ulazak adenovirusa u stanice nisu toliko dobro objašnjeni (slika 6) (McMahon i Boucrot, 2011).



Slika 6. Klatrin-ovisni i klatrin-neovisni internalizacijski putevi adenovirusa (McMahon i Boucrot, 2011)

2.2.3. Bijeg adenovirusa iz endosoma

Nakon ulaska u stanicu putem endocitoze, adenovirusi podskupine C oslobađaju se iz endosoma i ulaze u citosol. Nakon što se klatrinom obložena vezikula kao endocitička vezikula odvoji od plazma membrane, H⁺-ATPazna aktivnost u membrani endosoma zakiseljuje lumen organela. Ovaj enzim održava pH endosoma na 6,0 i regulira pH ostalih endocitoznih odjeljaka poput lizosoma. Zakiseljavanje endosoma pokreće promjene u kapsidi adenovirusa koje rezultiraju lizom endosomalne membrane i bijegom adenovirusne kapside u citosol. Dokaz da sniženi pH rezultira bijegom, dobiven je u istraživanju koje je proučavalo putovanje adenovirusa u stanici. Pokazano je da spojevi koji blokiraju zakiseljavanje endosoma dovode do zadržavanja adenovirusa podskupine C unutar organela obavijenih membranom i smanjene, adenovirusom posredovane ekspresije transgena. *In vitro* dokazi pokazuju da kapsida adenovirusa ima sposobnost lizirati lipidne dvoslojne membrane te da pH vrijednost koja je optimalna za njihovo liziranje odgovara pH vrijednosti endosoma. Litička aktivnost kapside zahtjeva blisku povezanost baze pentona adenovirusa s membranom, aktivaciju adenovirusne L3/p23 proteaze, protein VI, a pokazan je utjecaj i vlakna adenovirusa (Leopold i Crystal, 2007).

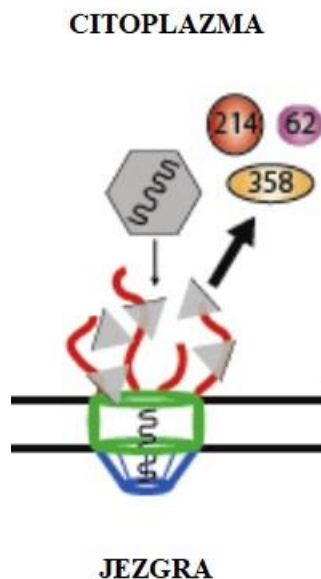
2.2.4. Unutarstanično putovanje adenovirusa

Nakon bijega u citosol, klasični infekcijski put adenovirusa podskupine C uključuje putovanje kapside uzduž mikrotubula prema jezgri. Ta udaljenost iznosi otprilike 100 kapsidnih dijametara (10 μm). Nakon bijega iz endosoma, kapsida adenovirusa nailazi na viskozni, gusti citosol koji predstavlja prepreku u slobodnoj difuziji adenovirusa. Kako bi se omogućilo unutarstanično putovanje, kapsida adenovirusa stupa u interakcije s citosolnim molekularnim motorima, dineinom i kinezinom, koji pokreću kapsidu uzduž mikrotubula, kroz citosol. Podaci dobiveni *in vitro* pokazuju da se adenovirusi vežu za mikrotubule interakcijom s citoplazmatskim dineinom, molekularnim motorom koji pokreće pokretljivost prema organizacijskom centru mikrotubula. Inhibicijom dineinom-posredovane pokretljivosti sprječava se nakupljanje adenovirusa u jezgi. Citoplazmatski dinein može generirati kretanje samo prema minus kraju mikrotubula, koji se kod većine mikrotubula u staničnoj kulturi nalazi u blizini jezgre, u organizacijskom centru mikrotubula. Druga obitelj molekularnih motora, kinezini, generiraju pokretljivost prema plus kraju mikrotubula odnosno periferiji stanice. Iako adenovirusi podskupine C mogu stupati u interakcije s kinezinima, podaci pokazuju da je kretanje prema periferiji stanice rijedak proces. U određenom trenutku tijekom infekcije,

kapsida adenovirusa mora se odvojiti od mikrotubula i stupiti u interakciju s jezgrom (Leopold i Crystal, 2007).

2.2.5. Unos adenovirusne DNA u jezgru stanice domaćina

Ograničena veličina kompleksa jezgrinih pora, NPC (engl. *nuclear pore complex*), koja regulira prolazak proteina, nukleinskih kiselina i otopljenih tvari kroz jezgrinu ovojnici, zahtjeva micanje virusne kapside prije nego što adenovirusna DNA uđe u jezgru. Kapsida se veže na Nup214, protein NPC-a, i kinezin-1. Nukleoporin Nup358, koji je vezan za Nup214/Nup88, stupa u interakcije s teškim lancem kinezina-1, kako bi neizravno povezo kapsidu s kinezinom. Kinezin-1 razbija kapside spojene na Nup214, što dislocira nukleoporine i fragmente kapside u citoplazmu, te dovodi do remećenja NPC-a uzrokujući povećanje propusnosti jezgrine ovojnice (slika 7). Dakle, kinezin-1 oslobađa adenovirusnu DNA i narušava integritet NPC-a, omogućavajući ulazak adenovirusnog genoma u jezgru, odnosno funkcionalnu infekciju (Strunze i sur., 2011).



Slika 7. Razbijanje adenovirusne kapside na NPC-u uzrokuje istovremeno oslobađanje adenovirusnog genoma u jezgru i istiskivanje Nup62, Nup214 i Nup358 u citoplazmu (Le Sage i Mouland, 2013)

2.3. ADENOVIRUSNI VEKTORI

Zahvaljujući velikom znanju molekularne biologije adenovirusa kao i razvoju metoda manipulacije virusnog genoma, adenovirusi su postali primamljivi kandidati za razvoj vektora. Jedna od glavnih prednosti adenovirusnih vektora je njihova sposobnost replikacije pri visokim titrima u komplementarnim staničnim linijama. Nadalje, mogu zaraziti veliki broj stanica koje se dijele ili ne dijele, a nakon ulaska u jezgru njihova se DNA ne ugrađuje u genom, već ostaje episomalno čime ne postoji rizik od insercijske mutageneze (Lee i sur., 2017; Arnberg, 2012). Postoji nekoliko generacija adenovirusnih vektora.

U vektorima prve generacije uklonjena su E1 i/ili E3 područja čime se onemogućila virusna replikacija, te je stvoreno mjesto za ugradnju do 7,5 kb strane DNA. Replikacijski defektni adenovirusi temeljeni na nedostatku E1 gena mogu se umnažati u ljudskim embrionalnim stanicama bubrega (HEK-293, engl. *human embryonal kidney*) koje *in trans* eksprimiraju upravo E1 gene (Amalfitano i sur., 1996; Graham i sur., 1977). Kod vektora prve generacije još uvijek može doći do slabe ekspresije adenovirusnih gena, što je dovoljno za izazivanje imunološkog odgovora domaćina.

U drugoj i trećoj generaciji vektora izbačeni su još neki geni (područja E1, E2 i E4) što je tim vektorima dodatno smanjilo imunogeničnost i toksičnost (Moorhead i sur., 1999; Amalfitano i sur., 1998; Lusky i sur., 1998). Za umnažanje ovih vektora potrebne su stanice koje komplementiraju sve defekte u AdV5 DNA.

U četvrtoj generaciji vektora visokog kapaciteta (engl. *high capacity ili gutless*) vektorima, uklonjeni su svi Ad5 geni koji kodiraju proteine (Lieber i sur., 1999; Hardy i sur., 1997). Ovi vektori sadržavaju samo ITR sljedove i pakirajući slijed, a mogu ugraditi do 37 kb strane DNA. Za njihovo umnažanje potrebni su pomoćni virusi i odgovarajuće komplementirajuće stanice (Douglas, 2004; Lundstrom, 2004). Kod pripreme ovih vektora nužno je odvojiti pomoćničke viruse od samih vektora visokog kapaciteta što još uvijek nije u potpunosti moguće (Sandig i sur., 2000).

2.4. ADENOVIRUS TIP 26

Adenovirus tip 26 (AdV26) pripada serotipu D koji sadrži najveći broj ljuskih adenovirusa. AdV26 ima kratko vlakno, samo 8 β ponavljanja, i RGD slijed u bazi pentona. Nedavno je pokazano da AdV26 ne veže faktor X. AdV26 je vrlo imunogeničan i moguće ga je namnožiti

do visokog titra u AdV5 E1-komplementirajućim stanicama što omogućava proizvodnju AdV26 vektora u dovoljnim količinama. Seroprevalencija AdV26 u generalnoj populaciji je niska pri čemu je 42 % ljudi negativno za AdV26 neutralizacijska antitijela pa je stoga AdV26 prepoznat kao iznimno dobar kandidat za razvoj vektorskih vakcina. Zbog svoje sigurnosti i povoljne imunogeničnosti vektorske vakcine temeljene na HAdV26 nalaze se u oko 30 kliničkih ispitivanja (U.S. National Library of Medicine, 2020), pri čemu je vakcina protiv SARS-CoV-2 u III. fazi ispitivanja (WHO, 2020). Vakcina protiv Ebole je prva vakcina temeljena na HAdV26 odobrena za upotrebu u Europskoj Uniji (EMA, 2020). Unatoč tome što su se vektorske vakcine na temelju AdV26 već našle na tržištu, znanje o osnovnoj biologiji ovog virusa je još uvijek nedostatno.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije i uređaji

Popis korištenih kemikalija i njihovih proizvođača nalazi se u tablici 1, dok je priprema pufera i otopina opisana u tablici 2. U tablici 3 navedeni su korišteni uređaji i pomagala te njihovi proizvođači.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

| KEMIKALIJA | PROIZVOĐAČ |
|---|------------------------|
| Cezij klorid | Sigma-Aldrich, SAD |
| Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , DMEM) | Lonza, Švicarska |
| Dimetil-sulfoksid (DMSO) | Gram Mol, Hrvatska |
| Fosfatni pufer (PBS) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Natrij-dodecilsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Proteinski marker za SDS-elektroforezu | Thermo Scientific, SAD |
| Nemasno mlijeko u prahu | Roth, Njemačka |
| Serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum</i> , FBS) | Invitrogen, SAD |
| Standard za elektroforezu | Thermo Scientific, SAD |
| Tripsin | Sigma, Njemačka |
| Tris baza | Sigma, Njemačka |
| Tris HCl | Sigma, Njemačka |
| Triton-X-100 | Sigma-Aldrich, USA |
| Puromicin | Thermo Scientific, SAD |
| Paraformaldehyd, PFA 4 % | Sigma, Njemačka |
| OptiMEM (engl. <i>minimum essential media</i>) | Gibco, SAD |
| 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT) | Sigma, Njemačka |
| Amonijev persulfat, APS 10 % | Serva, Njemačka |
| Akrilamid smjesa 30 % | Serva, Njemačka |
| Bisakrilamid | Serva, Njemačka |

| | |
|---|--------------------|
| N, N, N', N'- tetrametiletilendiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Tween-20®, C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆ | Sigma-Aldrich, SAD |
| <i>Western Lightening® Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus</i> | PerkinElmer®, SAD |
| <i>Western Lightening® Plus ECL Oxidizing Reagent Plus</i> | PerkinElmer®, SAD |
| Lipofektamin | Invitrogen, SAD |
| Etanol | Gram Mol, Hrvatska |
| Serum fetusa goveda (engl. fetal bovine serum, FBS) | Invitrogen, SAD |
| 2-merkaptetanol | Serva, Njemačka |

Tablica 2. Priprema pufera i otopina

| NAZIV | PRIPREMA |
|----------------------|--|
| 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 ₂ O |
| Pufer TD | 8 g NaCl i 0,38 g KCl otopi se u 150 mL diH ₂ O, doda se 0,1 g Na ₂ HPO ₄ i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH ₂ O, podesi pH na 7,4-7,5 te nadopuni do 1 L s diH ₂ O |
| Fosfatni pufer (PBS) | 2 g 2,7 mM KCl; 0,2 g 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,0 g 137 mM NaCl; 1,15 g 8 mM Na ₂ HPO ₄ u 1000 mL deH ₂ O |
| TBS pufer | 0,6 g 10 mM Tris; 4,38 g 150 mM NaCl u 500 mL biH ₂ O |
| Transfer pufer | 50 mL Tris-glicinski pufer pH 8,3; 350 mL biH ₂ O; 100 mL etanol |

| | |
|---|---|
| 6x koncentrirani pufer za uzorke (engl. sample buffer; za SDS-PAGE) | 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g SDS; 3 mL glicerola; 20 mg bromfenol-plavo; 1,2 mL 2-merkptoetanol u 10 mL biH ₂ O |
| Amidocrno boja 0,1 % | 10 mL octene kiseline, 45 mL metanola, 45 mL vode, 0,1 g amido black otopine u 100 mL |
| Otopina za odbojavanje | 7 mL octene kiseline, 40 mL metanola, 53 mL vode |
| Otopina CsCl gustoće 1,25 g mL ⁻¹ | 36,16 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera |
| Otopina CsCl gustoće 1,34 g mL ⁻¹ | 51,20 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera |
| Otopina CsCl gustoće 1,40 g mL ⁻¹ | 62 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera |

Tablica 3. Popis korištenih uređaja i pomagala

| NAZIV | PROIZVOĐAČ |
|--|------------------------------|
| Brojač stanica | Beckman Coulter, UK |
| Centrifuga do 50 mL | Heraeus, Njemačka |
| Centrifuga MSE Harrier 18/80 | CamLab, UK |
| Epruvete Ultra-Clear 344059 | Beckmann, SAD |
| Mikroskop Evos Cell Imaging | Thermo Scientific, SAD |
| Gumena strugalica | Falton Becton Dickinson, SAD |
| Hamilton igla | Hamilton, Švicarska |
| Igla za pročišćavanje virusa | Merck, Švicarska |
| Inkubator za uzgoj stanica | Thermo Scientific, SAD |
| Invertni svjetlosni mikroskop | Opton, Njemačka |
| Izvor napona za gel elektroforezu | Pharmacia LKB, Njemačka |
| Kabinet za sterilan rad | Klimaoprema, Hrvatska |
| Mikroepruvete | Eppendorf, Njemačka |
| Nanodrop | Thermo Scientific, SAD |
| Nitrocelulozna membrana (pore 0,45 μm) | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Petrijevka | Falton Becton Dickinson, SAD |

| | |
|--|------------------------------------|
| Pločice za uzgoj s 6, 12, 24 i 96 bunarića | Falton Becton Dickinson, SAD |
| Protočni citometar | FACSCalibur, Becton Dickinson, SAD |
| Uređaj za ultrazvučno razbijanje stanica | Cole Palmer, SAD |
| Stolna centrifuga | Eppendorf, Njemačka |
| Sustav za vertikalnu elektroforezu | Bio-Rad, Njemačka |
| Termoblok | Eppendorf, Njemačka |
| Tresilica | Tehtnica, Slovenija |
| Ultracentrifuga | Beckman, SAD |
| Vodena kupelj | Tehtnica, Slovenija |
| Vorteks | Tehtnica, Slovenija |

3.2. METODE

3.2.1. Stanična kultura *in vitro*

U ovom radu korištene su komercijalno dostupne stanične linije iz American Type Culture Collection (ATCC, SAD) i uzgajane su u uvjetima rasta kako je preporučeno od dobavljača: A549 (ATCC CCL-185) i HEK-293 (ATCC CRL-1573). Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) s dodatkom 10 % seruma fetusa goveda (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS), u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm. Nasađene stanice držane su u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i 5 % CO₂.

Stanice rastu pričvršćene za dno Petrijeve zdjelice sve dok gotovo u potpunosti ne iskoriste tekuću hranjivu podlogu te ih je tada potrebno presaditi. Prilikom presađivanja prvo je potrebno ukloniti hranjivu podlogu, isprati stanice s 1 mL PBS-a, koji se zatim ukloni, te dodati 1 mL tripsina koji je prethodno zagrijan u vodenoj kupelji pri 37 °C. Stanice se inkubiraju sve dok se ne odvoje od podloge za rast, nakon čega se dodaje ugrijana (37 °C) hranjiva podloga do ukupnog volumena od 10 mL kako bi se spriječilo djelovanje tripsina. Stanice se zatim nježno resuspendiraju i koriste za nova nasađivanja.

3.2.2. Izdvajanje stabilno utišanih klonova

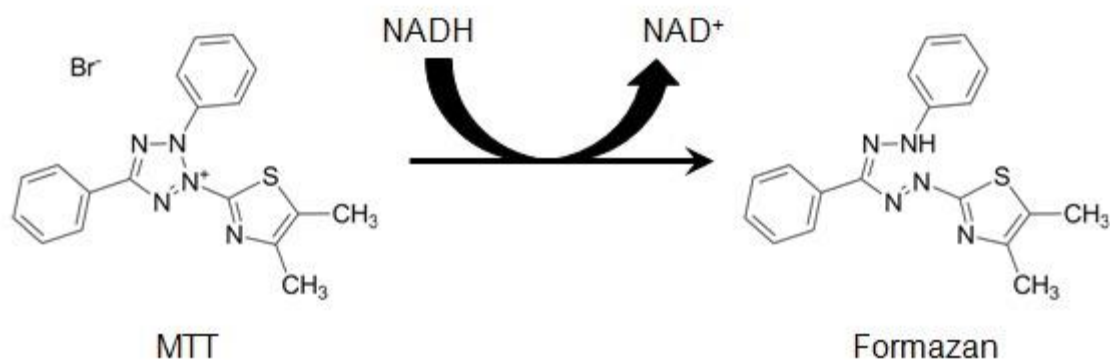
Klonovi A549 stanica sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina dobiveni su transfekcijom plazmidima koji sadrže gene za otpornost na antibiotik (za odabir uspješno transficiranih stanica) i shRNA (engl. *short hairpin RNA*) specifičnu za klatrin.

U ovom radu smo za transfekciju koristili komercijalno dostupan komplet za transfekciju liposomima Lipofectamine. Stanice smo transficirali kontrolnim plazmidom ili plazmidom koji sadrži slijed koji kodira shRNA za klatrin. A549 stanice nasadene su u 6 bunarića, 3×10^5 stanica po bunariću u 1,5 mL hranjivog medija. Pripremljene su otopine A i B, svaka u konačnom volumenu od 250 μ L, za svaki bunarić. Otopina A sadrži 5,56 μ L plazmidne DNA i 244,44 μ L OptiMEM-a, dok otopina B sadrži 8 μ L Lipofectanima i 242 OptiMEM-a. Ovako pripremljene otopine nakapane su na stanice.

24 h nakon transfekcije stanice su rasađene na dvadeset puta veću površinu u Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica u hranjivu podlogu uz dodatak antibiotika puromicina, u koncentraciji koja je određena u ovom radu. Hranjiva podloga s antibiotikom mijenja se svaka 4 dana do pojave prvih kolonija stanica. Pojedinačne kolonije su izdvojene struganjem sa sterilnim plastičnim nastavkom za mikropipetu i prenesene u bunariće pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića u koje je prethodno dodano 150 μ L hranjive podloge uz dodatak antibiotika. Klonovi su, nakon što su popunili bunarić pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, prebačeni u pločicu za uzgoj kulture stanica s 24 i konačno, 6 bunarića. Klonovima koji su prekrili površinu bunarića u pločici sa 6 bunarića je provjerena uspješnost smanjenja ili povećanja proteina od interesa metodom western blot. Nakon probira pozitivnih klonova, stanice su dalje uzgajane u hranjivoj podlozi bez antibiotika.

3.2.3. MTT test

MTT test je metoda za određivanje preživljenja stanica i u ovom radu je korištena u svrhu određivanja koncentracije antibiotika potrebnog za izdvajanje stabilnih klonova. NAD(P)H i dehidrogenaze iz metabolički aktivnih stanica reduciraju žutu tetrazolijevu sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u tamnoljubičasti formazan (Leović, 2016).



Slika 8. Strukture MTT-a i produkta reakcije formazana (Riss i sur., 2013)

Test se provodi u mikrotitrarskoj pločici s 96 bunarića gdje je po svakom bunariću nasadeno 10^4 stanica u $180 \mu\text{L}$ hranjive podloge, pri čemu su 3 bunarića ostavljena prazna za slijepu probu. Sljedeći dan je dodano $20 \mu\text{L}$ antibiotika puromicina u različitim razrijeđenjima ($0,03125 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,0625 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $6 \mu\text{g mL}^{-1}$) te je svako razrijeđenje pripremljeno u triplikatima. Kao kontrola dodano je po $20 \mu\text{L}$ hranjivog medija umjesto puromicina, također u triplikatima. Mikrotitrarska pločica inkubirana je 10 dana pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Zatim se naglim okretanjem pločice izlije hranjiva podloga kako bi se uklonile mrtve stanice koje bi mogle izazvati lažan pozitiv uzrokovan laktat dehidrogenazom. MTT štok je razrijeđen sterilnim zagrijanim hranjivim medijem u omjeru 1:10 ($4 \mu\text{L}$ štoka + $36 \mu\text{L}$ hranjivog medija u svaki bunarić). Pločica je inkubirana 3 h pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a u tom vremenskom periodu sukcinat dehidrogenaza reducira MTT u ljubičaste kristale formazana. Zatim je dodano $170 \mu\text{L}$ DMSO po bunariću koji je inkubiran 30 min kako bi se kristali formazana otopili. Nakon inkubacije pločica je stavljena na tresilicu kako bi se boja ravnomjerno rasporedila te kako bi nestali eventualni mjehurići zraka koji mogu povećati apsorbanciju. Izmjerena je apsorbancija uzoraka na čitaču pri valnoj duljini $\lambda = 600 \text{ nm}$ koja je proporcionalna preživljenju stanica koje se računa prema formuli:

$$\text{preživljenje (\%)} = \frac{\text{apsorbancija stanica izloženih puromicinu} - \text{apsorbancija negativne kontrole}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica} - \text{apsorbancija negativne kontrole}}$$

3.2.4. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa na jastučiću i gradijentu CsCl

U svrhu umnažanja replikacijski defektnih adenovirusa korištene su HEK-293 stanice čiji genom sadrži stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma. Stanice su inficirane adenovirusom te stavljene u inkubator (48-96 sati) kako bi se postigao citopatogeni učinak. Nakon inkubacije stanice je potrebno odvojiti od podloge, skupiti u epruvetu i centrifugirati pri 1100 x g, 10 minuta. Talog stanica se resuspendira u 10 mL podloge DMEM-FBS i potom se u tri ciklusa smrzava (na -20 °C) i odmrzava (na -37 °C) kako bi se virusi oslobodili iz stanica. Zatim je potrebno ponovno centrifugiranje pri 3600 x g, 10 minuta, kako bi se odvojio supernatant (virusne čestice) od taloga (ostaci stanica). Potom se adenovirusi iz supernatanta pročišćavaju na jastučiću CsCl gdje se prvo u epruvetu za centrifugiranje doda 2,4 mL CsCl gustoće 1,4 g mL⁻¹, obilježi se nivo CsCl te se vrlo nježno nadsloji s 2,5 mL CsCl gustoće 1,25 g mL⁻¹. Zatim se u epruvetu za centrifugiranje doda 7 mL supernatanta te se epruveta do vrha nadopuni s hranjivom podlogom DMEM-FBS. Epruvete se potom centrifugiraju u ultracentrifugi pri 20 °C i 60 000 x g tijekom 1 h i 30 min. Nakon centrifugiranja vidljiv je sloj virusa između dvaju slojeva CsCl, te se sloj virusa pokupi u maksimalnom volumenu od 2 mL pomoću šprice s iglom. Zatim se taj sloj virusa stavi u novu epruvetu te potom pomiješa s CsCl gustoće 1,34 g mL⁻¹. Istovremeno se za tariranje pripremi druga epruveta u koju je stavljen isti volumen CsCl gustoće 1,4 g/mL kako bi se brže ekvilibriralo. Epruvete se zatim centrifugiraju u centrifugi tijekom noći, pri 20 °C i 60 000 x g. Prilikom centrifugiranja stvorio se gradijent gustoće CsCl, a sloj virusa nalazi se u području koji odgovara njihovoj gustoći.

3.2.5. Western blot analiza

Western blot je metoda koja se koristi u staničnoj i molekularnoj biologiji u svrhu identifikacije određenih proteina iz otopine proteina ekstrahiranih iz stanica. Ta metoda se provodi u 3 koraka: 1. SDS-PAGE elektroforeza, 2. tranfer proteina na membranu i 3. obilježavanje ciljnog proteina pomoću odgovarajućeg primarnog i sekundarnog protutijela za vizualizaciju (Mahmood i Yang, 2012).

Prije provođenja pokusa nasadeno je 5x10⁵ stanica u pločicu sa 6 bunarića. Stanice su potom inkubirane tijekom noći pri 37 °C. Nakon toga stanice su sonificirane 3 puta po 5 sec pomoću ultrazvučne sonde, amplitude 30, te su smrznute na -20 °C.

3.2.5.1. SDS – PAGE

SDS-PAGE (engl. *sodium dedecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pri denaturirajućim uvjetima. Denaturirajući uvjeti postižu se dodatkom natrijeva dodecil-sulfata (SDS), anionskog detergenta, koji razara nekovalente interakcije u nativnom proteinu. U takvim uvjetima proteini se odjeljuju na osnovi molekulske mase, pri čemu proteini veće molekulske mase ostaju pri vrhu, dok proteini manje molekulske mase pređu veći put kroz gel. Put koji polipeptidni lanci pređu pod ovim uvjetima linearno je razmjernan logaritmu njihove mase (Berg i sur., 2013).

Prije pripreme gelova potrebno je složiti aparaturu za njegovo izlivanje, a zatim je potrebno pripremiti gelove za razdvajanje proteina: donji gel za razdvajanje i gornji gel za sabijanje uzoraka. Smjesa donjeg gela pripremljena je prema tablici 4, koja se ulije između dva stakla, te se na rub gela doda 70 % etanol i ostavi oko 30 min da se gel polimerizira.

Tablica 4. Sastav smjese gela za razdvajanje SDS-PAGE-a

| SASTOJAK | VOLUMEN [mL] |
|-------------------------------|--------------|
| diH ₂ O | 4,0 |
| Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M) | 2,5 |
| SDS (10 %) | 0,1 |
| APS (10 %) | 0,1 |
| akrilamid/bisakrilamid (30 %) | 3,3 |
| TEMED | 0,006 |

Nakon toga je izliven etanol i dodana je smjesa gornjeg gela koja je pripremljena prema tablici 5 i stavljen češljic za formiranje jažica. Gel je ostavljen dva sata kako bi polimerizacija u potpunosti završila. Potom je pripremljena aparatura za elektroforezu te su također pripremljene otopine pufera. Uzorci su grijani na termobloku pri 96 °C te su nanešeni po 30 µL na gel, dok je markera dodano 5 µL. Također je dodano SB u praznu jažicu, u istoj količini kao i uzoraka. Zatim je provedena elektroforeza pri naponu od 100 V sve dok fronta markera nije došla do dna (otprilike 2 h).

Tablica 5. Sastav smjese gela za sabijanje SDS-PAGE-a

| SASTOJAK | VOLUMEN [mL] |
|-------------------------------|--------------|
| diH ₂ O | 2,1 |
| Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M) | 0,38 |
| SDS (10 %) | 0,03 |
| APS (10 %) | 0,03 |
| akrilamid/bisakrilamid (30 %) | 0,5 |
| TEMED | 0,003 |

3.2.5.2. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na membranu

Nakon što je završila denaturirajuća elektroforeza, uklonjen je gel za sabijanje, a gel za razdvajanje uronjen je u transfer pufer oko 5-15 min da se ekvilibrira. Membrana je izrezana prema dimenzijama gela te prebačena u transefer pufer. Zatim je složen sendvič za prijenos u kojem je na jednu stranu kazete postavljeno: spužvica, filter papir, gel, membrana, drugi filter papir i spužvica, te je kazeta zatvorena. Proveden je prijenos proteina na membranu tijekom 90 min na 400 mA.

3.2.5.3. Detekcija ciljnog proteina pomoću odgovarajućeg primarnog i sekundarnog protutijela za vizualizaciju

Nakon prijenosa proteina na membranu, njihova prisutnost određena je pomoću primarnih i sekundarnih protutijela (tablica 6). Membrane su ispirane 5 min u TBST-u na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje na klackalici, a zatim su inkubirane u otopini za bojanje (0,1 % Amidoblack 10B, 10 % octene kiseline, 7,5 % metanola i diH₂O) oko 1 minutu. Membrana je potom odbojana otopinom za odbojavanje (40 % metanola, 7 % octene kiseline i diH₂O) 3 puta po 2 minute. Nakon toga membrane su blokirane u 10 % mlijeku (mlijeko u prahu otopljeno u TBST-u), 1 h pri sobnoj temperaturi, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje na membranu. Primarno protutijelo pripremljeno je u 10 mL 5 % mlijeka u TBST-u te je nanešeno na membranu i inkubirano tijekom noći na 4 °C. Nakon inkubacije uklonjeno je primarno protutijelo, membrana je isprana u TBST-u, potom je ispirana 10 min uz lagano miješanje na klackalici, također u TBST-u, te je na kraju ispirana 3 puta po 5 min na klackalici (u TBST-u). Nakon toga membrana je inkubirana sa sekundarnim protutijelom (u 5 % mlijeku u TBST-u; 1:5000), 2 h pri sobnoj temperaturi, uz lagano miješanje, te je uklonjeno sekundarno protutijelo, a membrana je ispirana tijekom 20 minuta u TBST-u. Kako bi se razvile membrane potrebno

je pripremiti luminiscentni supstrat ECL miješanjem reagensa 1 (250 µL) i reagensa 2 (250 µL) koji su potom pipetom nanoseni na membranu, te u mraku inkubirani 1 minutu. Prije detekcije signala uređajem za snimanje membrana (Uvitec), membrana je prekrivena plastičnom folijom.

Tablica 6. Primarno i sekundarno protutijelo korišteno za vizualizaciju u Western-blot metodi

| Protutijelo | Naziv | Domaćin | Razrijeđenje | Kataloški broj | Proizvođač |
|-------------|----------------------------|---------|--------------|----------------|------------------------------------|
| Primarno | Anticlathrine | kunić | 1:1000 | ab21679 | Abcam, United Kingdom |
| | Laktat dehidrogenaza (LDH) | miš | 1:400 | sc133123 | Santa Cruz Biotchnology, SAD |
| Sekundarno | Anti-miš | miš | 1:5000 | 554001 | BD, SAD |
| | Anti-zec | kunić | 1:5000 | 31466 | Invitrogen, SAD |

3.2.6. Određivanje koncentracije virusnih čestica u suspenziji pročišćenih virusa

Suspenzija pročišćenih virusa razrijedi se 3x u PBS puferu i 0,1 % SDS-u, inkubira se 10 min pri 56 °C te to uzrokuje oslobađanje viralne DNA iz čestica. Mikroeprovete se centrifugiraju oko 30 sec pri 10 000 x g te se mjeri apsorbancija pri 260 nm.

Koncentracija virusnih čestica računa se prema formuli: $N = A_{260} \cdot r \cdot 1,1 \cdot 10^{12}$ [pp mL⁻¹]. N označuje broj virusnih čestica u mL, A₂₆₀ je vrijednost apsorbancije izmjerene pri 260 nm, a r označuje razrijeđenje suspenzije adenovirusa.

3.2.7. Fluorescentno obilježavanje adenovirusa

Kako bi se adenovirusi fluorescentno obilježili, korištena je Alexa Fluor 488 5-TFP boja koja se veže na primarne amine proteina. Alexa Fluor 488 5-TFP dodaje se u 20 puta molarnom suvišku u odnosu na količinu adenovirusa. Obilježavanje adenovirusa odvija se u 100 mM natrij bikarbonatnom puferu uz prisustvo 10 % glicerola. Volumen navedenih komponenti prikazan je u tablici 7. Reakcijska smjesa inkubirana je 75 minuta u mraku, pri sobnoj

temperaturi. Za uklanjanje ostatka boje koja se nije vezala za adenoviruse korištena je Zeba Spin desalinizirajuća kolona. Nakon što su adenovirusi fluorescentno obilježeni, mjeri se njihova koncentracija.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za obilježavanje virusa

| Komponenta | Volumen [μL] |
|---|---------------------------|
| Alexa Flour 488 boja $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ | 5,29 |
| Suspenzija virusnih čestica 10^{11} pp ukupno | 100 |
| 100 mM natrij bikarbonatni pufer | 394,71 |

3.2.8. Protočna citometrija – određivanje uspješnosti transdukcije adenovirusima

Adenovirusi korišteni u ovom radu imaju ugrađeni gen koji kodira zeleni fluorescentni protein. Na temelju ekspresije ovog gena, postotak transduciranih stanica može se odrediti protočnom citometrijom. Protočna citometrija je tehnologija koja služi za sortiranje i analizu stanica. Metoda se bazira na obasjavanju laserom stanicu po stanicu, gdje se na temelju raspršenja svjetlosti vide fizikalna svojstva stanica (Welsh i sur., 2017). Prednosti protočnih citometara su: brzo mjerenje signala (više od 1000 stanica/sec), istodobno mjerenje fizikalnih i fluorescentnih signala te sortiranje stanica (Adan i sur., 2016).

Utvrdjivanje uspješnosti transdukcije adenovirusima provedeno je u A549 stanicama i stabilnim transfektantima sa smanjenom ekspresijom klatrina. U pločicu s 12 bunarića nasadi se 5×10^4 stanica po bunariću te se sljedeći dan stanice izbroje kako bi se odredila njihova točna količina. Korištena su tri adenoviralna razrjeđenja virusa AdV5, AdV26 i AdV35. Kako bi se odredio točan volumen virusnog razrjeđenja potreban za infekciju stanica, potrebno je znati koncentraciju virusne preparacije (N) i MOI vrijednost (engl. *multiplicity of infection*) odgovarajućeg adenovirusa (tablica 8). Dodaje se medij do konačnog volumena od $500 \mu\text{L}$ po uzorku i slijedi inkubacija 2 sata nakon čega se virusno razrjeđenje makne, a doda 1 mL svježeg medija. Nakon što je prošlo 48 h inkubacije, određuje se uspješnost transdukcije protočnim citometrom.

Tablica 8. MOI vrijednosti korištenih adenovirusa

| Serotip virusa | MOI vrijednost [pp stanica ⁻¹] |
|----------------|--|
| AdV5 | $1 \cdot 10^3$ |
| AdV26 | $1 \cdot 10^4$ |
| AdV35 | $1 \cdot 10^3$ |

Prije provođenja pokusa protočne citometrije potrebno je pripremiti uzorke tako što se prvo ukloni medij, zatim se podloga ispere s 400 μ L PBS-a, stanice se tripsiniziraju s 350 μ L tripsina te se doda PBS do ukupnog volumena od 1950 μ L. Uzorci se potom prebace u odgovarajuće FACS tubice (2 mL) koje se centrifugiraju 10 min pri 1100 x g. Potom se ukoni supernatant te se stanice fiksiraju s 1 % PFA (pripremljen iz 4 % PFA). Stanice se resuspendiraju u 100 μ L 1 % PFA u PBS-u te su držane 12 min na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 500 μ L PBS-a na stanice, koje se potom centrifugiraju 10 min pri 1100 x g. Nakon centrifugiranja ukloni se supernatant, u sve tubice doda se 250 μ L PBS-a te se s takvim uzorcima ide na protočni citometar.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je izdvojiti i okarakterizirati A549 stanice sa stabilno utišanom ekspresijom klatrina te utvrditi kakav utjecaj ima utišavanje klatrina na infekciju, odnosno na ulazak adenovirusnih vektora tipa 5, 26 i 35 (AdV5, AdV26 i AdV35) u A549 stanice. Naime, prema literaturnim podacima, poznato je da je klatrin uključen u endocitozu AdV5 te se u ovom radu smanjenjem ekspresije klatrina željelo ispitati da li istu ili sličnu ulogu klatrin ima i u uspješnosti transdukcije AdV26 i AdV35 (Meier i Greber, 2004).

Veliko znanje i razumijevanje adenovirusa na molekularnoj razini dovelo je do toga da se vektori na bazi adenovirusa upotrebljavaju kao vektorska cjepiva i vektori za prijenos gena (Majhen i sur., 2014). Adenovirusni vektor najčešće korišten u kliničkim istraživanjima je AdV5 koji je do sada ujedino i najbolje istražen adenovirus. Jedan od glavnih nedostataka ovog virusa je njegova visoka seroprevalencija te se stoga u svrhu razvoja novih vektora danas posebna pažnja posvećuje istraživanjima nisko seroprevalentnih adenovirusa kao što su AdV26 i AdV35 (Geisbert i sur., 2011). Podaci o osnovnoj biologiji AdV26 pa tako i načinu na koji ovaj virus ulazi u stanicu su vrlo skromni.

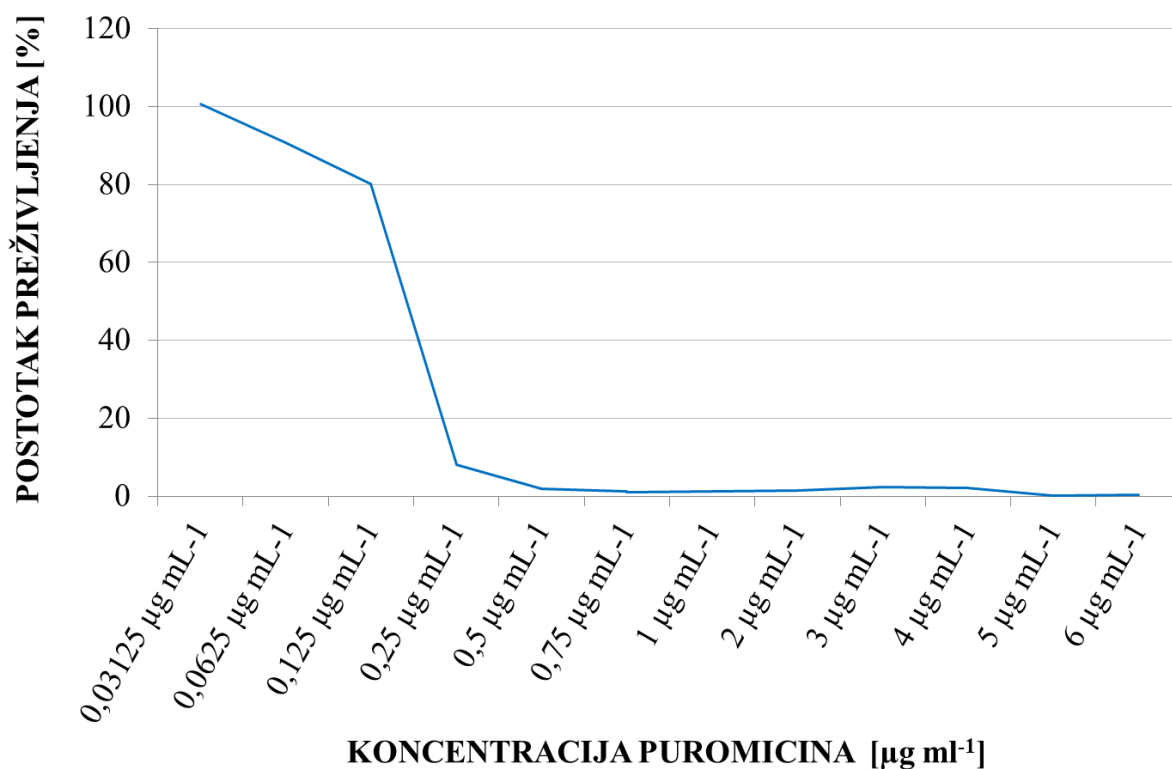
Da bi se mogao ispitati utjecaj utišavanja klatrina na infekciju adenovirusnim vektorima tipa 5, 26 i 35, prvo je bilo potrebno izdvojiti klonove A549 stanica sa smanjenom ekspresijom klatrina što je napravljeno stabilnom transfekcijom A549 stanica plazmidom koji kodira za specifičnu *short hairpin* RNA. Prije same stabilne transfekcije funkcionalnost plazmida koji kodira za sh klatrina (sh(CLTC)) provedena je prolazna transfekcija plazmidom te je uspješnost utišavanja provjerena metodom Western blot. Stabilnom transfekcijom izdvojena su tri stabilno transficirana klona A549 stanica sa smanjenom ekspresijom klatrina u usporedbi sa stanicama stabilno transficiranim s „praznim“ vektorom koji sadrži samo okosnicu plazmida te kao takav predstavlja negativnu kontrolu. Kako bi adenovirusima mogli inficirati odabrane klonove, prvo je provedeno umnožavanje i pročišćavanje adenovirusa. Odabrana tri klona A549 stanica sa smanjenom ekspresijom klatrina i A549 stanice stabilno transficirane s „praznim“ vektorom, inficirane su s AdV5, AdV26 i AdV35 te je uspješnost transdukcije određena protočnim citometrom.

U radu je istraživana značaj klatrinom posredovane endocitoze u uspješnosti transdukcije s AdV5, AdV26 i AdV35. Klatrin, ključni protein u ovom procesu, utišan je u A549 stanicama te je nakon određivanja uspješnosti transdukcije adenovirusa, pokazano da smanjenjem količine klatrina dolazi do smanjenja uspješnosti transdukcije s AdV5 i povećanja uspješnosti

transdukcije s AdV26. Smanjenje ekspresije klatrina nije imalo značajniji utjecaj na uspješnost transdukcije s AdV35. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na važnost klatrinom posredovane endocitoze u uspješnosti transdukcije AdV26 što do sada nije bilo poznato iz literature.

4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOSTI SUPSTANCE MTT TESTOM

Da bi se mogli izdvojiti klonovi stanica koje sadrže stabilno ugrađen transficirani plazmid, plazmidni vektor s odabranim ciljnim slijedom 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. Plazmidi koje smo koristili u ovom radu sadrže gen za otpornost na puromicin te je prije same stabilne transfekcije A549 stanica, prvo bilo potrebno utvrditi koncentraciju puromicina koja će dovesti do toga da sve stanice u koje se nije ugradio plazmid, koji sadrži gen za otpornost na puromicin, ne prežive. To se provodi testom preživljenja, MTT testom, opisanim u poglavlju Metode 3.2.3. Ispitane su koncentracije puromicina: $0,03125 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,0625 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na temelju dobivenih rezultata MTT-testa, napravljena je krivulja preživljenja iz koje se vidi % preživjelih stanica pri određenim koncentracijama puromicina (slika 9).



Slika 9. Preživljenje A549 stanica u ovisnosti o dodanoj koncentraciji puromicina

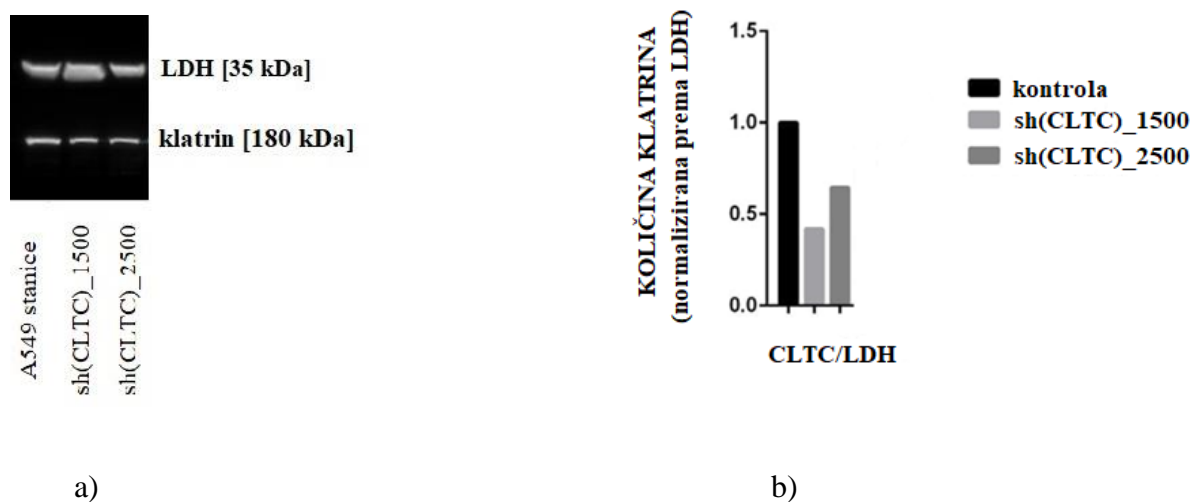
Koncentracija puromicina koja na temelju dobivenih rezultata je odabrana za provođenje stabilne transfekcije je $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ta koncentracija je odabrana jer su pri njoj sve stanice umrle i te će nakon transfekcije plazmidom koji nosi gen za otpornost na puromicin preživjeti jedino one stanice u koje se pod selektivnim pritiskom ugradio gen za rezistenciju na puromicin. Iako je i pri koncentraciji puromicina od $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ uočeno značajno umiranje stanica, za izdvajanje stabilnih klonova je odabrana koncentracija od $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, da bi se osigurao selektivni pritisak.

4.2. IZDVAJANJE I KARAKTERIZACIJA A549 KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KLATRINA

Prije samog postupka izdvajanja stabilnih klonova za provjeru funkcionalnosti plazmida koji kodira za shRNA klatrina napravljena je prolazna transfekcija A549 stanica. Plazmid sh(CLTC) prethodno je konstruiran u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signal, Institut Ruđer Bošković. Uspješnost utišavanja klatrina utvrđena je metodom Western blot. Za

prolaznu transfekciju korištene su dvije količine plazmida sh(CLTC): 1500 ng i 2500 ng. Western blot metodom detektirane su vrpce veličine 180 kDa, specifične za klatrin. Kao pozitivna kontrola, detektirane su vrpce veličine 35 kDa, specifične za laktat dehidrogenazu (LDH). Taj enzim je odabran kao kontrola jer je njegova lokalizacija u citosolu, što znači da njegova ekspresija u stanici nije povezana s ekspresijom klatrina te nam je kao takva mogla poslužiti kao standard za određivanje uspješnosti utišavanja klatrina (Rasmussen i sur., 2002).

Intenzitet vrpce proporcionalan je količini proteina u nanešenom uzorku. Na slici 11.a) vidljivo je da se intenzitet vrpce klatrina razlikuje u sva tri uzorka, pri čemu je najveći intenzitet u kontrolnom uzorku, A549 stanicama koje nisu transficirane plazmidom, dok je u preostala dva uzorka intenzitet vrpce nešto slabiji. Na temelju toga se već može vidjeti da je u 2. i 3. uzorku došlo do manje ekspresije klatrina, odnosno da je transfekcija plazmidom koji kodira za shRNA klatrina uspješno provedena. Da bi to potvrdili, napravljena je denzitometrija vrpce na temelju koje se može vidjeti da je korištenje 1500 ng plazmida dovelo do smanjenja ekspresije klatrina za čak 58 %, dok je korištenjem 2500 ng plazmida smanjena količina klatrina za 36 % (slika 10. b)). Na temelju ovih rezultata količina plazmida od 2500 ng odabrana je za nastavak istraživanja, odnosno provođenje stabilne transfekcije.

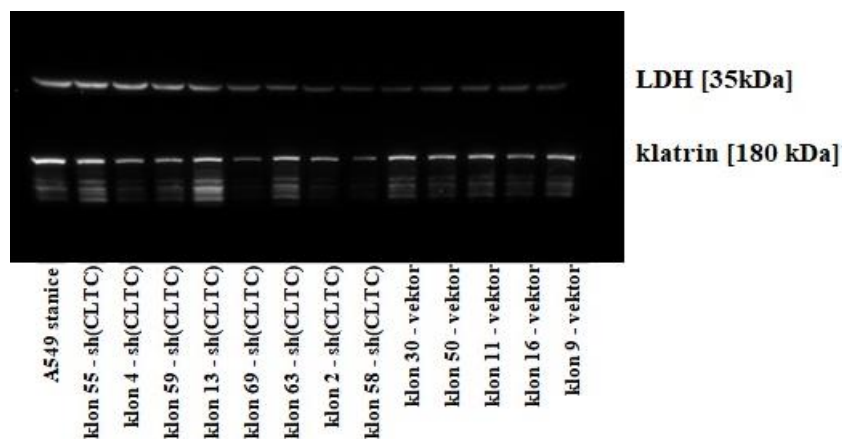


Slika 10. Ekspresija klatrina u A549 stanicama i A549 klonovima. A549 klonovi su dobiveni transfekcijom stanica s 1500 ng i 2500 ng plazmida koji sadrži shRNA specifičnu za klatrin

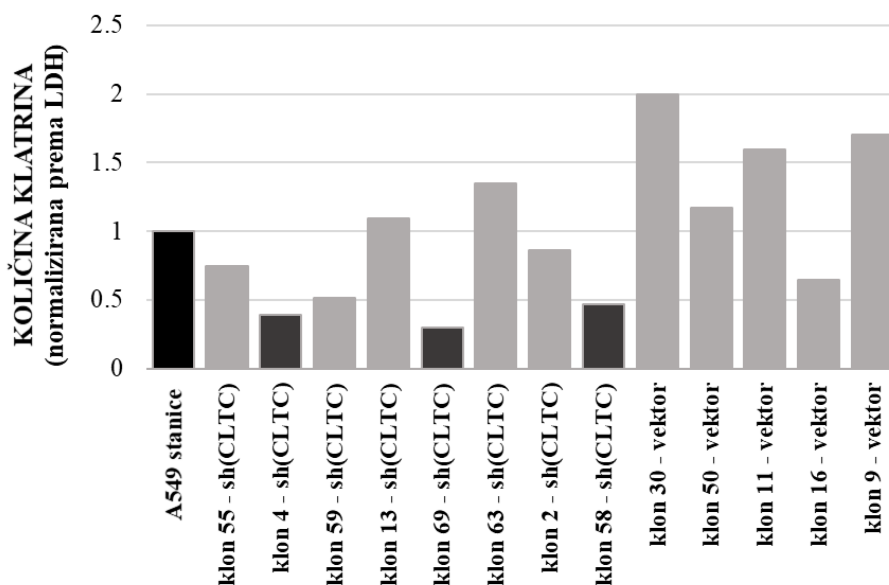
A549 stanice nasađene su na mikrotitarsku pločicu sa 6 bunarića te su nakon 24 sata transficirane plazmidom sh(CLTC) u količini od 1500 ng i 2500 ng. Kako bi se utvrdilo da li je došlo do uspješnog utišavanja klatrina, provedena je Western blot analiza. Na slici 10.a)

vidljive su vrpce specifične za protein klatrin i laktat dehidrogenazu (LDH), iz transficiranih i netransficiranih stanica. Na slici 10.b) prikazana je količina klatrina, normalizirana prema LDH, u kontrolnom uzorku te u uzorcima transficiranim s 1500 ng i 2500 ng plazmida.

Prolazna transfekcija često se koristi za proučavanje učinaka kratkotrajne ekspresije gena ili genskih produkata. Suprotno tome, stabilna transfekcija koristi se kada je potrebna dugotrajna ekspresija gena (Smith, 2013). U ovom diplomskom radu, nakon prolazne transfekcije i odabrane količine plazmida za nastavak istraživanja, provedena je stabilna transfekcija tako što su A549 stanice transficirane plazmidom koji nosi sh(CLTC) ili kontrolnim plazmidom koji se sastoji samo od okosnice plazmida, i izložene selektivnom pritisku. Da bi se omogućio selektivni pritisak, kao selektivni marker korišten je antibiotik puromicin. Taj antibiotik korišten jer iz razloga što plazmid s kojim su transficirane stanice sadrži gen za otpornost na taj antibiotik. Koncentracija puromicina od $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koja se koristila za selektivni pritisak odabrana je na temelju testa preživljenja A549 stanica izloženih puromicinu. Nakon provedbe stabilne transfekcije, izdvojeno je ukupno 13 klonova koji su pokazali otpornost na puromici. Osam klonova je izdvojeno transfekcijom plazmidom sh(CLTC), a pet transfekcijom kontrolnim vektorom. Svim izdvojenim klonovima je metodom Western blot određena ekspresija klatrina pri čemu je protein LDH odabran za normalizaciju ekspresije promatranog proteina (slika 11). Rast klonova u prisustvu puromicina je upućivao na to da se pod selektivnim pritiskom ugradio gen za antibiotik, odnosno da se ugradio plazmid, pa je bilo za očekivati da je u klonovima transficiranim sa sh(CLTC) plazmidom došlo do smanjenja ekspresije klatrina.



a)



b)

Slika 11. Ekspresija klatrina u A549 stanicama i A549 klonovima

Prvih osam uzoraka su A549 klonovi izdvojeni nakon stabilne transfekcije stanica s plazmidom koji kodira za shRNA klatrina, sh(CLTC), dok je zadnjih 5 uzoraka transficirano kontrolnim („praznim“) vektorom. A549 stanice nasađene su u pločicu sa 6 bunarića, 3×10^5 po bunariću, te su transficirane plazmidom sh(CLTC) ili kontrolnim plazmidom u količini od 2500 ng. Nakon stabilne transfekcije, izdvojeni su klonovi te je provedena Western blot analiza. Na slici 11.a) vidljive su vrpce specifične za protein klatrin i laktat dehidrogenazu (LDH), iz

transficiranih i netransficiranih stanica. Na slici 11.b) prikazana je količina klatrina, normalizirana prema LDH, u kontrolnom uzorku te u transficiranim uzorcima.

6 od 8 klonova izdvojenih transfekcijom s plazmidom sh(CLTC), klonovi 55, 4, 59, 69, 2 i 58, pokazuju smanjenu ekspresiju klatrina u odnosu na kontrolne A549 stanice. Preostala 2 klona (klonovi 13 i 63) pokazuju povećanu ekspresiju klatrina u odnosu na kontrolne stanice. Kako bi pokazali na koji način smanjena ekspresija klatrina utječe na ulazak AdV5, AdV26 i AdV35 u stanicu, za nastavak istraživanja su odabrana 3 klona s najmanjom ekspresijom klatrina, a to su klonovi 4, 69, 58, označeni tamno sivom bojom na slici 11.b). U tablici 9 navedeni su postoci koliko iznosi razina klatrina u odnosu na kontrolne A549 stanice.

Prilikom stabilne transfekcije plazmidna DNA se u genom domaćina ugrađuje nasumično u nepoznatom broju kopija. Od 5 klonova izdvojenih transfekcijom kontrolnim plazmidom četiri klona (klonovi 30, 11, 16 i 9) pokazuju ekspresiju klatrina veću u odnosu na netransficirane A549 stanice, a klon 50 ima ekspresiju klatrina usporedivu sa ekspresijom klatrina u netransficiranim A549 stanicama pa je kao takav izabran kao kontrolni klon za nastavak istraživanja.

Tablica 9. Vrijednosti razine klatrina u tri odabrana klona, u odnosu na kontrolne A549 stanicame

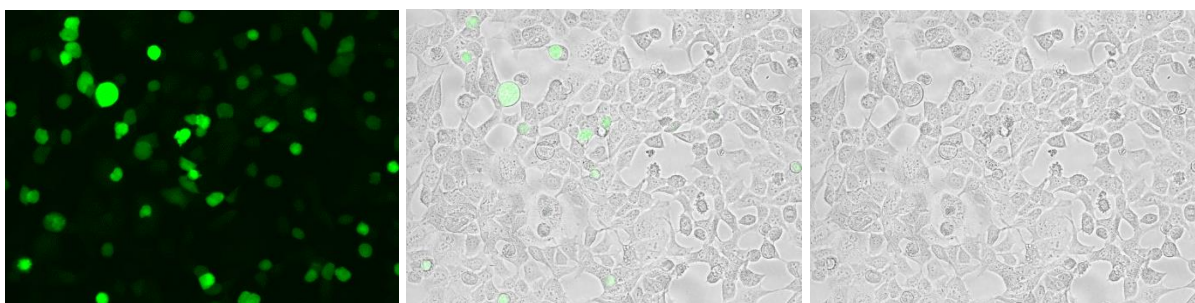
| A549 klonovi | Klon 4 | Klon 69 | Klon 58 |
|--|---------------|----------------|----------------|
| Razina klatrina u klonovima u odnosu na razinu u A549 stanicama | 38,93 % | 30,24 % | 46,83 % |

4.3. UMNAŽANJE I PROČIŠĆAVANJE ADENOVIRUSNIH VEKTORA

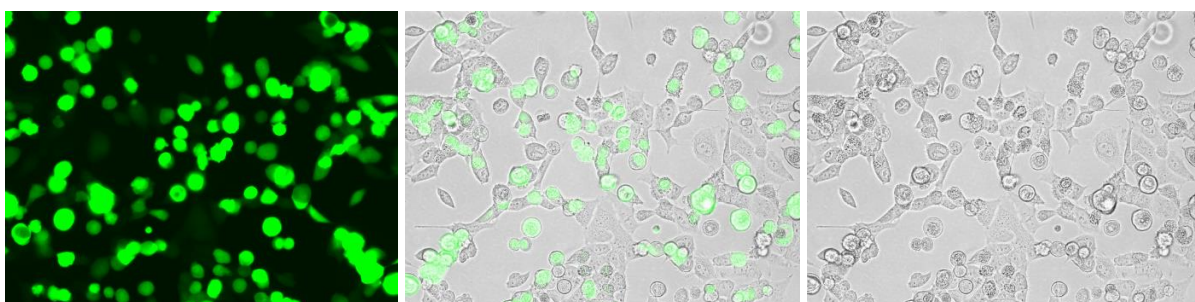
Replikacijski defektni adenovirusni vektori ispunjavaju dvije poželjnije karakteristike vektora za prijenos gena i vakcinaciju, a to su sposobnost umnažanja u visokom titru ($>10^{12}$ virusnih čestica/mL) i učinkovita infekcija različite stanice uključujući one koje se ne dijele i dijele (Kafri i sur., 1998). U ovom radu korišteni su replikacijski defektni adenovirusni vektori tipa 5, 26 i 35, koji kao transgen nose gen koji kodira za zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP) (Abbink i sur., 2007). Kao komplementirajuće stanice korištene su HEK-293 stanice, prethodno transficirane plazmidom koji sadrži slijed koji kodira za E1A/E1B regiju adenovirusnog genoma, koja je odgovorna za replikaciju adenovirusa (Xu i sur., 2006). Upravo zbog stabilno ugrađene E1 sekvence, omogućeno je da se replikacijski defektni adenovirusi repliciraju u HEK-293 stanicama.

Tako konstruirane HEK-293 stanice inficirane su adenovirusnim vektorima, te je nakon što se dogodio citopatogeni učinak, pokupljen talog stanica koje su sadržavale namnožene viruse. Citopatogeni učinak definira se kao degenerativne promjene u morfologiji stanica, koje su povezane s replikacijom adenovirusa (Martinez-Jaramillo i sur., 2018). Te su morfološke promjene, poput zaokruživanja stanica i gubitka njihove adhezije, praćene tijekom vremena što je prikazano na slici 12. Slika 12 prikazuje inficirane HEK293 stanice tijekom tri dana infekcije.

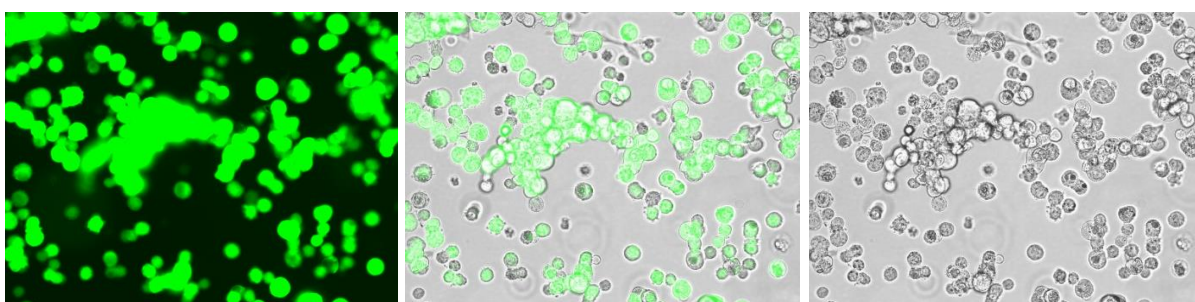
1. DAN INFEKCIJE



2. DAN INFEKCIJE



3. DAN INFEKCIJE

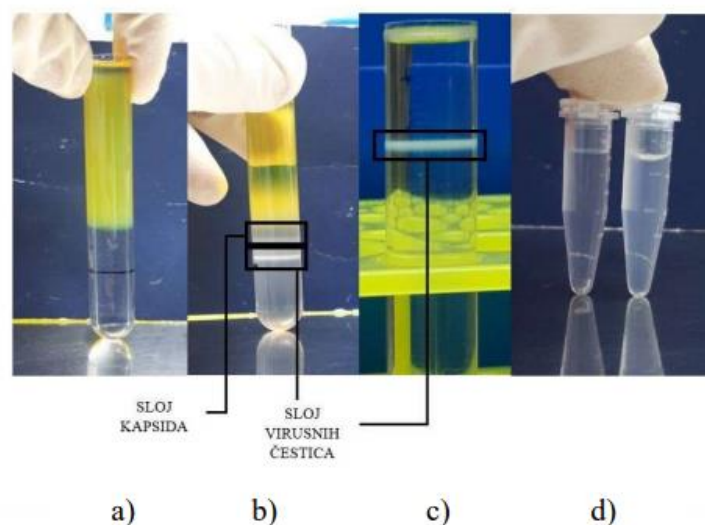


Slika 12. Prikaz inficiranih HEK293 stanica pomoću EVOS Cell Imaging sustava, kroz tri dana, praćen zelenom fluorescencijom i/ili faznim kontrastom

HEK-293 stanice prethodno uzgojene u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm, do otprilike 95 % konfluentnosti, inficirane su adenovirusima i praćene do pojave citopatogenog učinka. Vidljivo je da se intenzitet fluorescencije povećava s povećanjem broja dana, što ukazuje da se replikacija adenovirusa u HEK293 stanicama uspješno odvijala. Nakon umnažanja, sakupljen je talog stanica te je provedeno pročišćavanje adenovirusnih čestica centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu CsCl.

Rezultati centrifugiranja na jastučiću i u gradijentu CsCl prikazani su na slici 13.b) i 13.c), gdje se mogu vidjeti dva tanka, bjelkasta sloja. Ta dva sloja predstavljaju koncentrirane

adenovirusne čestice, pri čemu su gornji sloj adenovirusne kapside i moguće nečistoće, dok su donji sloj funkcionalne adenovirusne čestice. Kao što je već rečeno, adenovirusi koje smo koristili u ovom radu kao transgen imaju zeleni fluorescentni protein pa je u epruveti također vidljiva i zelenožuta boja koja dolazi od velike količine zelenog fluorescentnog proteina. Nakon prekonoćnog ultracentrifugiranja suspenzije adenovirusa u gradijentu CsCl dolazi do nakupljanja adenovirusnih čestica u sloju koji odgovara njihovoj masenoj gustoći, $1,34 \text{ g mL}^{-1}$. Ovako ukoncentrirane adenovirusne čestice potrebno je dodatno pročistiti, odnosno potrebno je ukloniti CsCl. To se provodi gel-filtracijom pomoću kolone Sephadex G-25M. Rezultati dobiveni provođenjem gel filtracije prikazani su na slici 13.d), gdje se vidi razlika između eluata s i eluata bez virusnih čestica. Frakcija koja ne sadrži viruse je prozirna s ravnom površinom, dok je frakcija s virusima bjelkaste boje s konkavnom površinom. Nakon što je sakupljen eluat s adenovirusnim česticama, dodan je glicerol do 10 % konačnog volumena. Dobivena suspenzija je alikvotirana i pohranjena pri $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 13. Pročišćavanje adenovirusnih čestica

a) Uzorak spreman za ultracentrifugiranje. b) Nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl, dobivena su 2 sloja adenovirusa. Jedan sloj je sloj ukoncentriranog adenovirusa, koji se nalazi na granici različitih gustoća CsCl, a drugi sloj su prazne kapside. c) Sloj adenovirusa, nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl, nalazi se u području koje odgovara gustoći adenovirusne čestice, $1,34 \text{ g mL}^{-1}$. d) Propuštanjem izoliranog sloja virusnih čestica kroz kolone za

pročišćavanje, dobivena su 2 eluata. Lijevo je prikazan eluat bez virusnih čestica, a desno eluat s virusnim česticama. Frakcija koja ne sadrži viruse je prozirna s ravnom površinom, dok je frakcija s virusima bjelkaste boje s konkavnom površinom (Švec, 2020).

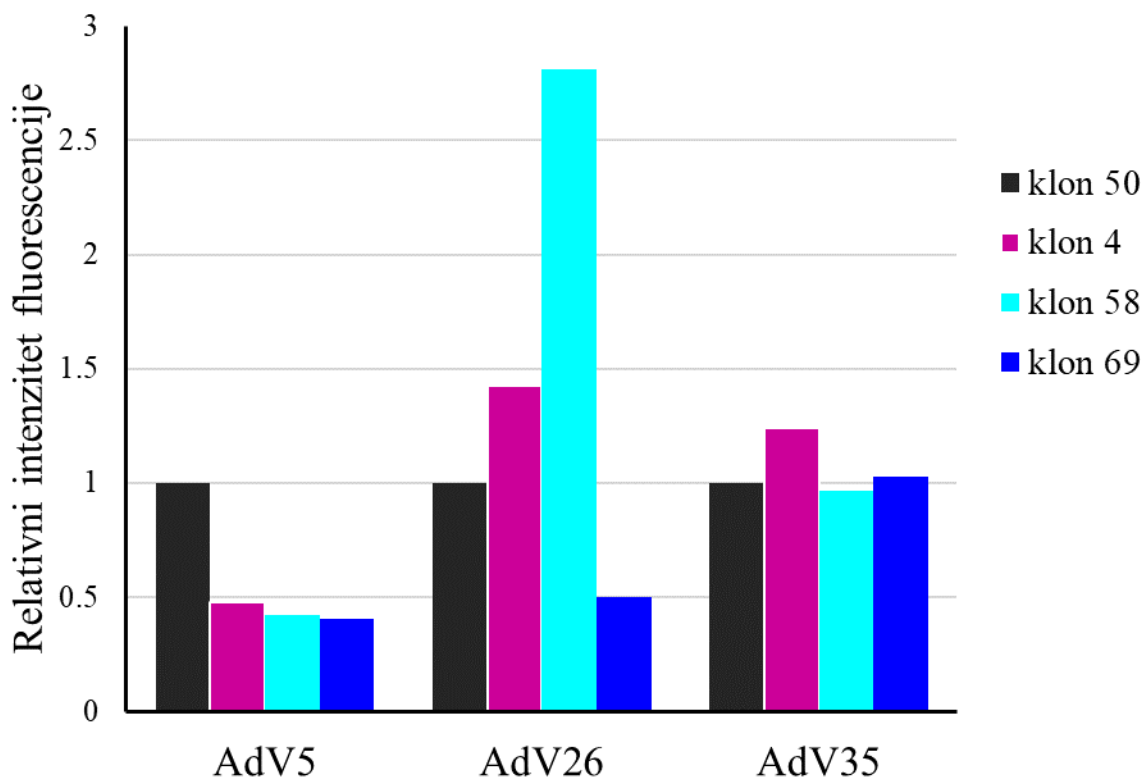
4.4. INFEKCIJA A549 KLONOVA SA SMANJENOM EKSPRESIJOM KLATRINA ADENOVIRUSNIM VEKTORIMA TIP 5, 26 I 35

Danas se adenovirusni vektori intenzivno koriste za prijenos gena u *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* uvjetima. Ulazak u stanicu ljudskog adenovirusa tipa 5, serotipa koji se najčešće koristi kao genski vektor, odvija se klatrin posredovanom endocitozom. Prvo se AdV5 veže za primarni receptor, CAR (engl. *coxsackie and adenovirus receptor*), zatim čestice koje su usidrene na CAR-u aktiviraju koreceptore integrina što pokreće razne stanične reakcije, uključujući i endocitozu (Granio i sur., 2009; Meier i Greber, 2004). Za razliku od AdV5, primarni receptor za AdV26 još nije u potpunosti definiran, međutim nedavno je pokazano da je za uspješnu transdukciju A549 stanica ovim virusom neophodno prisustvo $\alpha\beta 3$ integrina (Nestić i sur., 2019). Također je poznato da u proces infekcije AdV26, za razliku od AdV5, nisu uključeni faktori zgrušavanja krvi. S obzirom na nižu seroprevalenciju i jedinstvena biološka svojstva, AdV26 se intenzivno razvija kao vektorska vakcina (Turner i sur., 2015). Međutim, niti u jednom znanstvenom radu nije utvrđeno na koji način AdV26 ulazi u stanicu. Dok se kod AdV5 internalizacija odvija klatrin posredovanom endocitozom, ulazak AdV35 u stanicu odvija se makropinocitozom, počevši vezanjem za primarni receptor CD46 (Kälin i sur., 2010; Meier i Greber, 2004). Kako bi se potvrdila, odnosno ispitala uloga klatrina u infekciji adenovirusnih vektora tipa 26, 5 i 35, kontrolni klon 50 i odabrana 3 klona sa smanjenom ekspresijom klatrina (klonovi 4, 58, 69), inficirani su navedenim adenovirusnim vektorima. Uspješnost infekcije adenovirusnim vektorima određena je protočnim citometrom, budući da svi korišteni vektori imaju ugrađen gen koji kodira za GFP. Na slici 14 pokazan je graf koji prikazuje relativni intenzitet fluorescencije svakog uzorka, inficiranog sa Ad vektorima tipa 5, 26 i 35.

Iz grafa prikazanog na slici 14 vidljiv je značajan pad uspješnosti transdukcije AdV5 u sva tri klona sa smanjenom ekspresijom klatrina. Naši rezultati određivanja uspješnosti transdukcije AdV5 nakon utišavanja klatrina u skladu su s podacima iz literature. Naime, poznato je da glavni put ulaska AdV5 u stanicu klatrinom posredovana endocitoza (Meier i Greber, 2004), te je bilo za očekivati da će smanjenje ekspresije klatrina uzrokovati smanjenu uspješnost transdukcije AdV5.

Utišavanje klatrina nije imalo utjecaj na uspješnost transdukcije AdV35. Ovi rezultati poklapaju se s literaturnim podacima za AdV35, gdje se navodi da je glavni put ulaska AdV35 u stanicu makropinocitoza (Kälin i sur., 2010) koja nije ovisna o klatrinu.

Utišavanje klatrina u klonovima 4 i 58 rezultiralo je povećanjem uspješnosti transdukcije AdV26. Za razliku od klonova 4 i 58, klon 69 pokazuje smanjenu uspješnost transdukcije s AdV26 u usporedbi s kontrolnim klonom 50. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je klatrin uključen u endocitozu AdV26. Da u procesu infekcije AdV26 važnu ulogu ima količina klatrina može se zaključiti i iz činjenice da je u klonu 69, klonu u kojem je došlo do najvećeg smanjenja ekspresije klatrina, odnosno količina klatrina u tom klonu najmanja je u odnosu na ostale klonove sa smanjenom ekspresijom klatrina, došlo do smanjenje uspješnosti transdukcije AdV26. Ovi rezultati upućuju na pretpostavku da je klatrin uključen u endocitozu AdV26, no u nastavku istraživanja potrebno je istražiti koja je točno uloga klatrina u transdukciji ovim virusom. Osim u odvajanju klatrinom obložene vezikule u kojoj se nalazi adenovirus odnosno unutarstaničnom putovanju AdV26, klatrin također može biti uključen i u recikliranje receptora koji AdV26 koristi za infekciju stanica. Trenutno u literaturi ne postoje studije koje opisuju molekule uključene u endocitozu AdV26.



Slika 14. Određivanje uspješnosti transdukcije AdV5, AdV26 i AdV35 u A549 klonovima sa smanjenom ekspresijom klatrina

Klonovi A549 stanica, kontrolni klon i klonovi sa smanjenom ekspresijom klatrina, nasađeni su u pločicu s 12 bunarića, 5×10^5 stanica po bunariću. Sljedeći dan provedena je transdukcija adenovirusima AdV26, AdV5 i AdV35 u trajanju od 2 h te je nakon inkubacije od 48 h provjerena uspješnost transdukcije. Uspješnost transdukcije određena je protočnim citometrom te je prikazana relativno prema kontrolnom klonu 50.

5. ZAKLJUČCI

1. Transfekcijom A549 stanica plazmidom koji kodira za shRNA za klatrin i selektivnim pritiskom primjenom puromicina izdvojeni su stabilni stanični klonovi koji u usporedbi s roditeljskim A549 stanicama pokazuju smanjenu ekspresiju klatrina.
2. Smanjenje ekspresije klatrina značajno smanjuje uspješnost transdukcije AdV5 što je u skladu s podacima iz literature prema kojima je endocitoza AdV5 ovisna o klatrinu.
3. Smanjenje ekspresije klatrina povećava uspješnost transdukcije AdV26 pa se može zaključiti da klatrin ima važnu ulogu u endocitozi AdV26.
4. Smanjena ekspresija klatrina nema značajan utjecaj na uspješnost transdukcije AdV35.

6. LITERATURA

Abbink, P., Lemckert, A. A., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Smits, S., Holterman, L., Damen, I., Vogels, R., Thorner, A. R., O'Brien, K. L., Carville, A., Mansfield, K. G., Goudsmit, J., Havenga, M. J., Barouch, D. H. (2007) Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J. Virol.* **81**(9), 4654-4663.

Abe, S., Okuda, K., Ura, T., Kondo, A., Yoshida, A., Yoshizaki, S., Mizuguchi, H., Klinman, D., Shimada, M. (2009) Adenovirus type 5 with modified hexons induces robust transgene-specific immune responses in mice with pre-existing immunity against adenovirus type 5. *J. Gene Med.* **11**, 570-579.

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2016) Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **37**, 163-176.

Amalfitano, A., Hauser, M. A., Hu, H., Serra, D., Begy, C. R., Chamberlain, J. S. (1998) Production and characterisation of improved adenovirus vectors with E1, E2B and E3 genes deleted. *J. Virol.* **72**, 926-933.

Amalfitano, A., Begy, C.R., Chamberlain, J. S. (1996) Improved adenovirus packaging cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**(8), 3352-3356.

Arnberg, N. (2012) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci.* **33**, 442-448.

Benevento, M., Di Palma, S., Snijder, J., Moyer, C. L., Reddy, V. S., Nemerow, G. R., Heck, A. J. R. (2014) Adenovirus composition, proteolysis and disassembly studied by indepth qualitative and quantitative proteomics. *J. Biol. Chem.* **289**, 11421-11430.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Strayer, L. (2013) Biokemija, 1, izd. (preveli Weygand Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb, str. 72.

Berk, A. J. (2016) Discovery of RNA splicing and genes in pieces. *PNAS* **113**(4), 801-805.

Charman, M., Herrmann, C., Weitzman, M. D. (2019) Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication, *Adenoviruses Biology, Disease and Therapy* **593**, 3531-3550.

Douglas, J. T. (2004) Adenovirus-mediated gene delivery: an overview. *Methods Mol. Biol.* **246**, 3-14.

EMA (2020) Science Medicines Health. EMA - European Medicines Agency,

<https://www.ema.europa.eu/en>. Pristupljeno 27. prosinca 2020.

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 (AdV26) and AdV35 Vaccine Vectors Bypass Immunity to AdV5 and Protect Nonhuman Primates against Ebolavirus Challenge. *J. Virol.* **85**(9), 4222-4233.

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

Graham, F. L., Smiley, J., Rusell, W. C., Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. of Gen. Virol.* **36**, 59-72.

Grano, O., Porcherot, M., Corjon, S., Kitidee, K., Henning, P., Eljaafari, A., Cimorelli, A., Lindholm, L., Miossec, P., Boulanger, P., Hong, S. S. (2009) Improved Adenovirus Type 5 Vector-Mediated Transduction of Resistant Cells by Piggybacking on Coxsackie B-Adenovirus Receptor-Pseudotyped Baculovirus. *J. Virol.* **83**(12), 6048-6066.

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

Kafri, T., Morgan, D., Krahl, T., Sarvetnick, N., Sherman, L., Verma, I. (1998) Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: Implications for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**(19), 11377-11382.

Kälin, S., Amstutz, B., Gastaldelli, M., Wolfrum, N., Boucke, K., Havenga, M., DiGennaro, F., Liska, N., Hemmi S., Greber, U. F. (2010) Macropinocytotic Uptake and Infection of Human Epithelial Cells with Species B2 Adenovirus Type 35. *J. Virol.* **84**(10), 5336–5350.

Kozarsky, K. F., Wilson, J. M. (1993) Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**(3), 499-503.

Kremer, E. J., Nemerow, G. R. (2015) Adenovirus Tales: From the Cell Surface to the Nuclear Pore Complex. *PLoS Pathog.* **11**(6), e1004821.

- Le Sage, V., Mouland, A. J. (2013) Viral Subversion of the Nuclear Pore Complex. *Viruses* **5**, 2019-2042.
- Lee, C. S, Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., Wolf, J. M., Reid, R. R., Hec, T.-C. (2017) Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis.* **4**(2), 43-63.
- Leopold, P. L., Crystal, R. G. (2007) Intracellular trafficking of adenovirus: Many means to many ends. *Science direct* **59**(8), 810-821.
- Leović, J. (2016) Protutumorski učinci novih N-9 sulfonilpurina (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Lieber, A., Steinwaerder, D. S., Carlson, C. A., Kay, M. A. (1999) Integrating adenovirus- adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J. Virol.* **73**, 9314-9324.
- Liu, H., Wu, L., Zhou, Z. H. (2011) Model of the trimeric fiber and its interactions with the pentameric penton base of human adenovirus by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **406**, 764-774.
- Lundstrom, K. (2004) Gene therapy applications of viral vectors. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3**(5), 467-477.
- Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A., Mehtali, M. (1998) In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A or E1/E4 deleted. *J. Virol.* **72**, 2022-2032.
- Mahmood, T., Yang, P.C. (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429-434.
- 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**(4), 301-317.

Martinez-Jaramillo, E., Garza-Morales, R., Wechman, S. L., Montes de Oca-Luna, R., Saucedo-Cardenas, O., Shirwan, H., Yolcu, E., McMasters, K. M., Gomez-Gutierrez, J. G. (2018) Adenovirus lacking E1b efficiently induces cytopathic effect in HPV-16-positive murine cancer cells via virus replication and apoptosis. *Cancer Invest.* **36**(1), 19-27.

McMahon, H. T., Boucrot, E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Mol. cell biol.* **12**, 517-533.

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

Moorhead, J. W., Clayton, G. H., Smith, R. L., Schaack, J. (1999) A replication-incompetent adenovirus vector with the preterminal protein gene deleted efficiently transduces mouse ears. *J. Virol.* **73**, 1046-1053.

Nadeau, I., Kamen, A. (2003) Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol. Adv.* **20**, 475-489.

Nemerow, G. R., Pache, L., Reddy, V., Stewart, P. L. (2009) Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* **384**, 380-388.

Nestić, D., Uil, T. G., Ma, J., Roy, S., Vellinga, J., Baker, A. H., Custers, J., Majhen, D. (2019) $\alpha\beta 3$ Integrin is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26. *J. Virol.* **93**(1), e01474-18.

Rasmussen, H. N., van Hall, G., Rasmussen, U. F. (2002) Lactate dehydrogenase is not a mitochondrial enzyme in human and mouse vastus lateralis muscle. *J. Physiol.* **541**, 575-580.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2013) Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual (Internet)*.

Rubanyi, G. M. (2001) The future of human gene therapy. *Mol. Aspects Med.* **22**(3), 113-142.

Saha, B., Parks, R. J. (2017) Human adenovirus type 5 vectors deleted of early region 1 (E1) undergo limited expression of early replicative E2 proteins and DNA replication in non-permissive cells. *PLoS One.* **12**(7), e0181012.

Sandig, V., Youil, R., Bett, A. J., Franlin, L. L., Oshima, M., Maione, D., Wang, F., Metzker, M. L., Savino, R., Caskey, C. T. (2000) Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**(3), 1002-1007.

Smith, C. (2013) Stable vs. Transient Transfection of Eukaryotic Cells. *Biocompare*.

Strunze, S., Engelke, M. F., Wang, I-H., Puntener, D., Boucke, K., Schleich, S., Way, M., Schoenenberger, P., Burckhardt, C. J., Greber, U. F. (2011) Kinesin-1-Mediated Capsid Disassembly and Disruption of the Nuclear Pore Complex Promote Virus Infection. *Cell Host Microbe* **10**, 210-223.

Švec, D. (2020) Utjecaj utišavanja kaveolina-1 na uspješnost transdukcije adenoviralnim vektorima tipa 5, 26 i 35 (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Turner, M. A., Middha, S., Hofherr, S. E., Barry, M. A. (2015) Comparison of the Life Cycles of Genetically Distant Species C and Species D Human Adenoviruses Ad6 and AdV26 in Human Cells, *J. Virol.* **89**, 12401-12417.

U.S. National Library of Medicine (2020) - ClinicalTrials.gov,

<<https://clinicaltrials.gov/>>. Pristupljeno 27. prosinca 2020.

Walters, R. W., Freimuth, P., Moninger, T. O., Ganske, I., Zabner, J., Welsh, M. J. (2002) Adenovirus Fiber Disrupts CAR-Mediated Intercellular Adhesion Allowing Virus Escape. *Cell* **110**, 789-799.

Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A., Nemerow, G. (1998) Adenovirus Internalization and Infection Require Dynamin. *J. Virol.* **72**(4) 3455-3458.

Welsh, J. A., Holloway, J. A., Wilkinson, J. S., Englyst, N. A. (2017) Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, 78.

WHO - World Health Organization,

<<https://www.who.int/>>. Pristupljeno 27. prosinca 2020.

Xu, Q., Arevalo, M. T., Pichichero, M. E., Zengcorresponding, M. (2006) A new complementing cell line for replication-incompetent E1-deleted adenovirus propagation. *Cytotechnology* **51**(3), 133-140.

Zhang, W.-W. (1999) Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* **6**, 113-138.

Zhang, Y., Bergelson, J. M. (2005) Adenovirus Receptors. *J. Virol.* **79**, 12125-12131.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Petra Lindić

Ime i prezime studenta