Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

ISABELA DRAŠKOVIĆ

UNUTARSTANIČNO PUTOVANJE ADENOVIRUSA TIPA 26 I UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR U STANICAMA EPITELA ČOVJEKA

Doktorska disertacija

Ocjena rada u tijeku

Zagreb, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Doktorska disertacija**

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstveno polje: Biologija; Temeljne medicinske znanosti

UNUTARSTANIČNO PUTOVANJE ADENOVIRUSA TIPA 26 I UROĐENI IMUNOSNI ODGOVOR U STANICAMA EPITELA ČOVJEKA

Isabela Drašković

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković

Mentor: dr. sc. Dragomira Majhen, znanstvena savjetnica

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Vektori temeljeni na adenovirusu čovjeka tipa 26 (HAdV-D26) pokazali su se izuzetno učinkovitim za vakcinaciju u in vivo istraživanjima te se već primjenjuju u kliničkom liječenju ljudi. Unatoč njihovoj primjeni, osnovna biologija HAdV-D26 još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, a mogla bi doprinijeti razvoju još sigurnijih i učinkovitijih vektora. U ovoj doktorskoj disertaciji utvrđeno je da HAdV-D26 u epitelnim stanicama čovjeka zaostaje u kasnim endosomima/lizosomima. Nadalje, pokazano je da utišavanje proteina Rab9 potiče izlazak virusa iz ovih odijeljaka te poboljšava uspješnost transdukcije. Također je utvrđeno da različito unutarstanično putovanje HAdV-D26 dovodi do različite aktivacije urođenog imunosnog odgovora. Konačno, rezultati upućuju na to da je TLR3 najvjerojatnije uključen u prepoznavanje HAdV-D26 i aktivaciju signalnih puteva koji potiču ekspresiju *IL6* i *IL8*.

Broj stranica: 114

Broj slika: 28

Broj tablica: 18

Broj literaturnih navoda: 176

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: adenovirus tipa 26, endosomi, proteini Rab, Tollu-slični receptori, ekspresija gena

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1.

2.

3.

4. (zamjena)

5. (zamjena)

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ocjena rada u tijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **PhD thesis**

University of Dubrovnik

Ruđer Bošković Institute

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular Biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary area of science

Scientific Field: Biology, Basic medical sciences

INTRACELLULAR TRAFFICKING OF ADENOVIRUS TYPE 26 AND INNATE IMMUNE RESPONSE IN HUMAN EPITHELIAL CELLS

Isabela Drašković

Thesis performed at Ruđer Bošković Institute, Division of Molecular Biology, Laboratory for Cell Biology and Signalling

Supervisor: dr. Dragomira Majhen, senior scientist

Short abstract:

Vectors based on human adenovirus type 26 (HAdV-D26) have proven highly effective in in vivo studies and are already in clinical use for vaccination purposes. Nevertheless, the fundamental biology of this vector remains incompletely understood, and gaining deeper insight could contribute to the development of safer vectors. This doctoral dissertation demonstrated that in human epithelial cells, HAdV-D26 accumulates in late endosomes and lysosomes. Silencing of the Rab9 protein was found to enhance viral escape from these vesicles and improve transduction efficiency. Furthermore, it was shown that different intracellular trafficking routes of HAdV-D26 lead to differential activation of the innate immune response. Finally, the data suggest that TLR3 is likely involved in recognizing HAdV-D26 and in triggering signaling pathways that regulate the expression of cytokine genes IL6 and IL8.

Number of pages: 114

Number of figures: 28

Number of tables: 18

Number of references: 176

Original in: Croatian

Key words: adenovirus type 26, endosomes, Rab proteins, Toll-like receptors, gene expression

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1.

2.

3.

4. (substitute member)

5. (substitute member)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ocjena rada u tijeku

Ocjena rada u tijeku

Ova doktorska disertacija je izrađena u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Dragomire Majhen, znanstvene savjetnice, u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost *Endocitoza adenovirusa i urođeni imunosni odgovor* (HRZZ-IP-2019-04-6048).

Ocjena rada u tijeku

Sadržaj

1. Uvod 10

1.1. Podjela adenovirusa 1

1.2. Struktura adenovirusa 2

1.3. Životni ciklus adenovirusa 3

1.3.1. Vezanje adenovirusa na receptor 4

1.3.2. Ulazak adenovirusa u stanicu i unutarstanično putovanje 6

1.4. Urođeni imunosni odgovor na infekciju adenovirusom 8

1.4.1. Prepoznavanje adenovirusa 8

1.4.2. Receptori slični Toll-u 8

1.4.3. Prijenos signala uslijed infekcije adenovirusom 9

1.5. Vektori temeljeni na adenovirusima 12

1.6. Adenovirus čovjeka tipa 26 12

1.6.1. Vektori za cijepljenje temeljeni na adenovirusu tipa 26 13

1.7. Endocitoza 14

2. Cilj istraživanja 19

3. Materijali i metode 18

3.1. Materijali 20

3.1.1. Osnovne kemikalije 20

3.1.2. Puferi i otopine 21

3.1.3. Stanične linije 22

3.1.4. Replikacijski defektni adenovirusni vektori 22

3.1.5. Kompleti kemikalija 23

3.1.6. Protutijela 23

3.1.7. Kemijski inhibitori 24

3.1.8. Početnice 24

Ocjena rada u tijeku

3.1.9. Male interferirajuće RNA (siRNA) 25
3.1.10. Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali 25
3.1.11. Računalni programi 26
3.2. Metode 27
3.2.1. Uzgoj staničnih linija 27
3.2.2. Umnažanje i pročišćavanje HAdV-D26 centrifugiranjem u cezijevom kloridu 28
3.2.3. Obilježavanje HAdV-D26 fluorescentnom bojom 29
3.2.4. Određivanje koncentracije HAdV-D26 u suspenziji pročišćenih adenovirusa 29
3.2.5. Određivanje uspješnosti transdukcije HAdV-D26 metodom spektrofotometrije 30
3.2.6. Utišavanje gena transfekcijom malih interferirajućih RNA molekula 30
3.2.7. Razdvajanje proteina elektroforezom u natrij dodecil sulfat poliakrilamidnom gelu i western blot 31
3.2.8. Kolokalizacija fluorescentno obilježenog HAdV-D26 s markerom ranog ili kasnog endosoma metodom imunofluorescencije 32
3.2.9. Određivanje ekspresije gena citokina i kemokina potaknutih transdukcijom HAdV-D26 lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja 34
3.2.10. Određivanje količine izlučenih citokina i kemokina nakon transdukcije HAdV-D26 metodom ELISA 36
3.2.11. Analiza dinamike dostave adenovirusne DNA u jezgru stanice metodom izolacije DNA iz nuklearne frakcije 37
4. Rezultati 19
4.1. Utjecaj inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i povećane ekspresije integrina αvβ3 na unutarstanično putovanje HAdV-D26 39
4.1.1. Inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze i povećana količina integrina αvβ3 uzrokuju sporije oslobađanje HAdV-D26 iz ranog endosoma i njegovo smanjeno zaostajanje u kasnom endosomu 39

Ocjena rada u tijeku

4.1.2. Proteini Rab5 i Rab7 sudjeluju u regulaciji unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 u ranom endosomu dok protein Rab9 regulira unutarstanično putovanje HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu.....47

4.1.3. Smanjena količina proteina Rab7 pospješuje transdukciju HAdV-D26 u stanicama A549-E6 dok smanjena količina proteina Rab9 pospješuje transdukciju HAdV-D26 u stanicama A549.....50

4.1.4. Protein Rab9 utječe na dostavu DNA HAdV-D26 u jezgru stanice 51

4.1.5. Zaustavljanje zakiseljavanja kasnih endosoma/lizosoma povećava uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 53

4.1.6. Uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 nije poboljšana kotransdukcijom s HAdV-C5 54

4.2. Aktivacija urođene imunosti nakon transdukcije HAdV-D26 u uvjetima različitog unutarstaničnog putovanja 55

4.2.1. Zaustavljanje HAdV-D26 u blizini membrane stanice povećava razinu ekspresije i lučenja IL6 i IL8 u stanicama A549 i A549-E6.....55

3.2.2. Razina ekspresije gena *IL6* u stanicama A549 i A549-E6, uslijed zaustavljanja HAdV-D26 u blizini membrane stanice, kao i nakon infekcije HAdV-D26 u stanicama A549-E6, djelomično ovisi o aktivnosti kinaze p38 57

3.2.3. Zaustavljanje HAdV-D26 u blizini membrane stanice potiče aktivaciju transkripcijskog faktora NF-κB p65 u stanicama A549 te NF-κB p65 i IRF3 u stanicama A549-E6 60

3.2.4. Adaptor MyD88 djelomično je uključen u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom gena *IL8* u stanicama A549-E6 transduciranim HAdV-D26 63

4.2.5. Razina ekspresije gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6 u kojima je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane, kao i *IL8* nakon infekcije HAdV-D26 u stanicama A549, djelomično ovisi o adaptoru TICAM-1 66

4.2.6. Ekspresija gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6, u kojima je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane stanice, ne ovisi o TLR4.....69

5. Rasprava 38

Ocjena rada u tijeku

6. Zaključci 71

7. Literatura 89

8. Sažetak 92

9. Summary 108

10. Životopis i popis publikacija 110

Ocjena rada u tijeku

1. Uvod

Ocjena rada u tijeku

1.1. Podjela adenovirusa

Adenovirusi su virusi veličine 90-100 nm svrstani u porodicu *Adenoviridae*. Osnovne karakteristike virusa unutar ove porodice uključuju ikozaedralnu strukturu, proteinsku kapsidu bez ovojnice i dvolančanu DNA molekulu kao genetski materijal [1]. Unutar porodice *Adenoviridae* razlikuje se šest rodova: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Testadenovirus*, *Barthadenovirus* i *Siadenovirus* [2]. Specifičnost svakog roda određena je domaćinom kojeg virus inficira pri čemu virusi iz roda *Mastadenovirus* inficiraju čovjeka. Prvi adenovirus čovjeka (eng. *human adenovirus*, HAdV) izoliran je pedesetih godina prošlog stoljeća iz adenoidnog tkiva djeteta [4]. Korištenjem seroloških metoda identificiran je ukupno 51 tip adenovirusa čovjeka, dok je napretkom metoda sekvenciranja i bioinformatičkih analiza otkriveno dodatnih 65 tipova, koji su svi svrstani u grupe A-G [3, 4]. Adenovirusi posjeduju vrlo raznolik tropizam što znači da mogu inficirati različite vrste stanica i tako izazvati različite bolesti (Tablica 1). Većina adenovirusnih infekcija zahvaća gastrointestinalni, respiratorni i sustav oka, dok grupe A i B mogu inficirati i stanice urinarnog trakta. Zanimljivo je da su određeni tipovi adenovirusa iz grupe D povezani s pretilošću kod životinja i ljudi [3]. Infekcije HAdV javljaju se tijekom cijele godine i prenose se kapljičnim ili fekalno-oralnim putem [5]. Iako su bolesti uzrokovane adenovirusima uglavnom blagog karaktera, mogu izazvati težu kliničku sliku kod imunokompromitiranih osoba i djece [6]. Dodatni problem predstavljaju infekcije u zatvorenim zajednicama, gdje se virus može brzo širiti, što je zabilježeno posljednih godina kroz epidemije adenovirusa [7, 8].

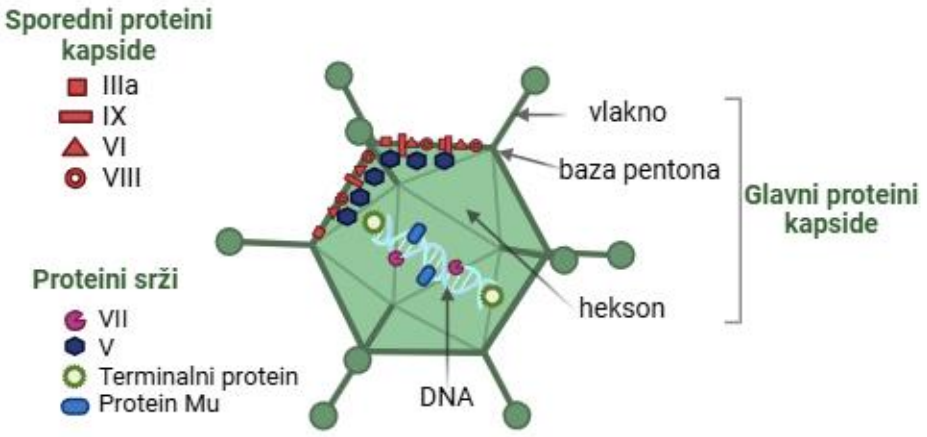
Tablica 1. Podjela adenovirusa čovjeka i sustavi koje inficiraju

Grupa adenovirusa	Tip adenovirusa	Bolesti
A	12, 18, 31, 61	Gastrointestinalni, resporatorni, urinarni sustav
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66	Gastrointestinalni, respiratorni, urinarni i sustav oka
C	1, 2, 5, 6, 57	Gastrointestinalni, respiratorni sustav
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-67,	Gastrointestinalni, respiratorni i sustav oka; pretilost
E	4	Respiratorni sustav
F	40, 41	Gastrointestinalni sustav
G	52	Gastrointestinalni sustav

Ocjena rada tijeku

1.2. Struktura adenovirusa

Adenovirus je građen od proteinske kapside i srži (slika 1). Kapsida je izrađena od glavnih i sporednih proteina, a među glavnim proteinima nalaze se hekson, baza pentona i vlakno koje se proteže iz baze pentona. Ukupno, kapsida se sastoji od 252 morfološke podjedinice, tzv. kapsomere, od kojih 240 čine heksoni raspoređeni po cijeloj površini kapside, a preostalih 12 kapsomera čine vrhovi ikozaedralne strukture, pentoni. Svaki penton sastoji se od baze pentona na koju je nekovalentno vezano vlakno koje završava petljom, a koje ima ulogu u prepoznavanju receptora na površini stanice i ulasku virusa u stanicu domaćina. Osim glavnih, kapsida sadrži i sporedne proteine – IIIa, IX, VI i VIII – koji djeluju kao cementni proteini. Njihova funkcija je povezivanje glavnih proteina kapside sa srži virusa, čime se dodatno stabilizira struktura virusa.



Slika 1. Shematski prikaz strukture proteinske kapside i srži adenovirusa. Proteinsku kapsidu čine glavni i sporedni proteini, a srž čini molekula DNA s vezanim proteinima. *Prilagođeno prema [4] i izrađeno u Biorender.com.*

U unutrašnjosti adenovirusa, srži, nalazi se dvolančana DNA duljine 36 kb i proteini VII, V, terminalni protein i protein Mu. Oni su uključeni u organizaciju i zaštitu virusne DNA te imaju ulogu u replikaciji virusa nakon infekcije [5, 6]. Na krajevima adenovirusnog genoma nalaze se obrnuto ponavljajuće sekvence (eng. *inverted terminal repeats*, ITRs) u kojima je sadržano ishodište replikacije. Geni se, ovisno o trenutku ekspresije, dijele na rane, intermedijarne i kasne gene. Prvo se eksprimiraju rani geni (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4) i proizvode proteini potrebni za početak ekspresije ostalih virusnih gena, proteini nužni za replikaciju virusne DNA te proteini uključeni u sprječavanje smrti inficirane stanice

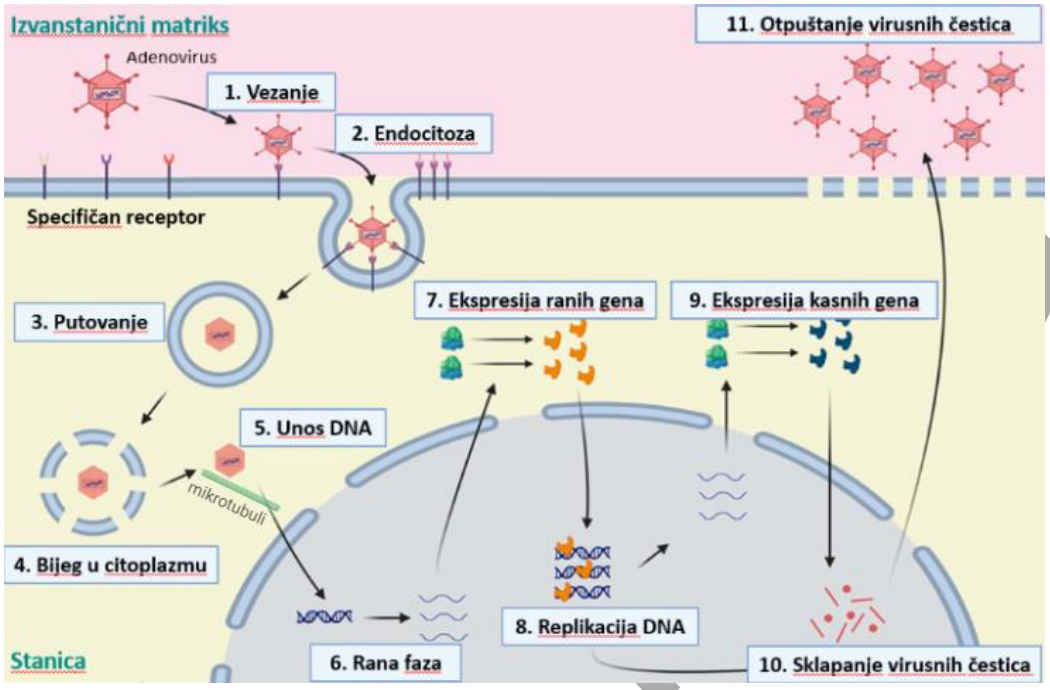
Ocjenski rad u tu

supresijom imunosnog odgovora. Zatim slijedi ekspresija intermedijarnih transkripcijskih jedinica koje sadrže gene koji kodiraju i) virusu pridružene VAI i VAII RNA molekule (eng. *virus-associated*) uključene u ometanje ekspresije staničnih gena uključenih u antivirusni odgovor, te ii) proteine koji sudjeluju u transkripciji kasnih gena i slaganju novih virusnih čestica. Na poslijetku, s istog, glavnog promotora počinje ekspresija svih kasnih gena (L1 do L5) i dolazi do proizvodnje proteina koji grade virus ili sudjeluju u sastavljanju novih adenovirusa [7, 8].

1.3. Životni ciklus adenovirusa

Životni ciklus adenovirusa započinje vezanjem adenovirusa na specifičan receptor na površini stanice domaćina, čime započinje endocitoza virusne čestice. Tijekom procesa endocitoze dolazi do formiranja endosoma unutar kojeg adenovirus putuje po stanici. Kako bi uspješno dostavio svoj genetički materijal u jezgru stanice, adenovirus mora pobjeći iz endosoma. Nakon bijega u citosol, adenovirus se veže na mikrotubule i putuje prema jezgri gdje dolazi do unosa virusne DNA i započinje ekspresija adenovirusnih gena. Tim procesom postupno dolazi do sklapanja virusnih proteina u zrele adenoviruse koji uslijed lize stanice izlaze van (slika 2).

Ocjena rada u tijeku



Slika 2. Shematski prikaz životnog ciklusa adenovirusa. Infekcija adenovirusom počinje vezanjem adenovirusnog vlakna na stanične receptore. Ovo vezanje aktivira internalizaciju adenovirusa putem endocitoze. Tijekom unutarstaničnog putovanja adenovirus se oslobađa iz endosoma i veže na mikrotubule u blizini jezgre. Interakcija s kompleksom nuklearnih pora omogućava unos virusne DNA u jezgru. Replikacija adenovirusa podijeljena je u dvije faze: ranu fazu tijekom koje se eksprimiraju rani geni koji reguliraju ekspresiju drugih virusnih gena kao i gena stanice domaćina. Druga faza replikacije adenovirusne DNA počinje ekspresijom kasnih adenovirusnih gena. Koordinacija aktivnosti omogućuje sastavljanje novih adenovirusa koje se oslobađaju lizom stanice. *Prilagođeno prema* [9] *i izrađeno u Biorender.com.*

1.3.1. Vezanje adenovirusa na receptor

Infekcija adenovirusom započinje vezanjem vlakna i baze pentona na receptore na površini stanice domaćina. Vlakno se sastoji od dvije domene: petlje koja ulazi u interakciju s receptorom, i drške, koja ga povezuje s kapsidom virusa. Razlika u duljini i fleksibilnosti vlakna između različitih tipova adenovirusa može utjecati na njihovu sposobnost vezanja na receptor i učinkovitost infekcije. Na primjer, adenovirusi iz skupine C imaju duže i fleksibilnije vlakno u usporedbi s adenovirusima iz skupine B ili D [10, 11] dok adenovirusi tipa 40 i 41 iz grupe F posjeduju dvije različite vrste vlakna – dugo i kratko [12].

Na površini stanice prisutno je više molekula na koje se HAdV mogu vezati. Među njima su: CAR (engl. *Coxsackie and Adenovirus Receptor*, CAR), integrini, CD46, sijalinska kiselina, heparansulfat proteoglikani, glavni kompleks tkivne snošljivosti (engl. *major histocompatibility complex molecule 1,* MHC-I), CD80 i CD86 (Slika 3). Većina adenovirusa,

Ocjena u tijeku

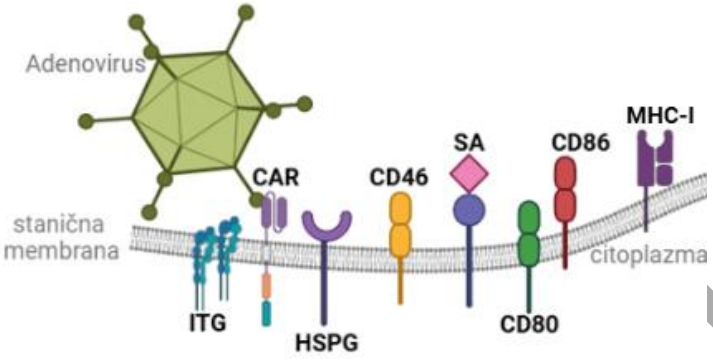
osim onih iz grupe B koriste CAR za infekciju stanica [13-15].

CAR je transmembranski protein uključen u formiranje međustaničnih spojeva u epitelnom tkivu i održavanju homeostaze tkiva [16]. Vezanje adenovirusa na CAR predstavlja primarnu interakciju visokog afiniteta koja potom omogućuje sekundarnu interakciju s koreceptorima, integrinima, odgovornu za ulazak virusa u stanicu [17]. Integrini su heterodimerni transmembranski proteini sastavljeni od jedne α i jedne β podjedinice. Kod ljudi razlikujemo 18 α podjedinica i 8 β podjedinica koje međusobno mogu tvoriti 24 heterodimera. Biološka važnost integrina u stanicama očituje se u njihovoj ulozi u regulaciji stanične adhezije, proliferacije te prijenosa signala [18]. Svi tipovi HAdV, osim tipa 40 i 41, imaju RGD motiv (tripeptid arginin-glicin-aspartat) u bazi pentona koji ima ulogu u vezanju virusa za integrine [12]. Interakcija integrina i RGD slijeda potiče nakupljanje dodatnih molekula integrina čime se aktiviraju signalni putevi, što uključuje aktivaciju PI3K (engl. *Phosphoinositide 3-kinases*; PI3K) i Rho obitelj malih GTPaza te dovodi do reorganizacije aktina i ulaska adenovirusa u stanicu endocitozom posredovanom receptorom [19]. Do sad je pokazano da su u ulazak HAdV-a uključeni integrini: αvβ1, αvβ3, αvβ5, α3β1 i α5β1 [20]. Adenovirusi grupe B koriste CD46 kao receptor za infekciju stanica, pri čemu tipovi unutar skupine pokazuju različiti afinitet vezanja za ovaj receptor [21]. CD46 je membranski protein s ulogom u zaštiti stanice od smrti uslijed aktivacije komplementom. Vezanje adenovirusa na CD46 aktivira različite signalne puteve i potiče ulazak virusnih čestica u stanicu makropinocitozom. Neki adenovirusi grupe B (tip 3, 7 i 14) ne koriste CD46 kao primarni receptor, već transmembranski glikoprotein desmoglein-2 [22]. Dodatno, zabilježeno je da pojedini adenovirusi iz grupe D (tip 37 i 49) mogu koristiti CD46 kao primarni receptor [23].

Uz navedene receptore pokazana je i povezanost: i) adenovirusa grupe D sa sijalinskom kiselinom, monosaharidom koji se kod ljudi veže na glikoproteine na površini stanica [24], ii) povezanost adenovirusa grupe B s molekulama CD80 i CD86 [25] te iii) adenovirusa tipa 5 iz grupe C s heparansulfat proteoglikanima, makromolekulama na površini stanica [26].

Pojednostavljeno, izbor receptora koje adenovirus koristi za ulazak u stanicu ovisi o tipu adenovirusa, vrsti stanice te o dostupnosti receptorskih molekula na površini stanice. Takva varijabilnost predstavlja osnovu za raznolik tropizam adenovirusa.

Ocjena rada u tijeku



Slika 3. Molekule na površini stanice uključene u infekciju adenovirusom. Kratice: CAR - *coxsackievirus and adenovirus receptor*, HSPG - heparansulfat proteoglikani, SA – sijalinska kiselina, ITG – integrini, MHC-I – glavni kompleks tkivne snošljivosti I, CD46, CD80 i CD86. *Prilagođeno prema [27] i izrađeno u Biorender.com.*

1.3.2. Ulazak adenovirusa u stanicu i unutarstanično putovanje

Interakcijom adenovirusa i receptora na površini stanice započinje internalizacija virusa endocitozom, temeljnim staničnim procesom u eukariotskim stanicama tijekom kojeg dolazi do unosa izvanstaničnih molekula. Adenovirusi se nakon ulaska u stanicu endocitozom nalaze u endosomima i ulaze u složen proces razvrstavanja endosoma unutar stanice. Za pojedine tipove adenovirusa već je pokazana ovisnost unutarstaničnog putovanja o endosomima i proteinima koji određuju njihov identitet. Na primjer, adenovirusi iz grupe B (tip 7 i 35) nakupljaju se u kasnim endosomima/lizosomima, dok adenovirusi grupe C (tip 2 i 5) brzo izlaze iz ranih endosoma i ne ulaze u kasne endosome/lizosome [28, 29]. Dodatno, adenovirus iz grupe F (tip 41) raspršen je po stanici i ne lokalizira unutar kasnog endosoma [30]. Zanimljivo, adenovirus iz grupe D (tip 37) u stanice rožnice oka čovjeka ulazi nekanonskim putem koji je neovisan o ranom endosomu, ali ovisan o kasnom endosomu [31].

Iako je bijeg iz endosoma ključan korak u životnom ciklusu adenovirusa bez kojeg nema unosa DNA u jezgru domaćina, o njemu se još uvijek malo zna. Poznato je da adenovirusi čovjeka tip 2 (HAdV-C2) i tip 5 (HAdV-C5) koriste sporedni protein kapside, protein VI, za lizu membrane endosoma [32]. Naime, tijekom ulaska u stanicu i putovanja u endosomima struktura adenovirusa se mijenja i dolazi do odvajanja vlakna zbog čega se na površini kapside izlaže protein VI [33, 34]. Iako su ranija istraživanja podupirala da je bijeg

Ocjena rada u tijeku

adenovirusa iz endosoma ovisan o niskom pH, novija istraživanja pokazuju da bijeg adenovirusa iz endosoma ne ovisi o niskom pH [32, 35]. Dodatna potvrda je i to da do gubitka vlakna i izlaganja proteina VI dolazi već na staničnoj membrani uslijed interakcija između CAR-a i vlakna te integrina i baze pentona. Zajedno, navedene interakcije dovode do difuznog kretanja adenovirusa na membrani zbog kojeg se odvaja vlakno i na površini kapside izlaže protein VI [35-37]. Protein VI ima litičku aktivnost i razara membranu endosoma čime se adenovirus oslobađa u citoplazmu [38].

Nakon bijega iz endosoma djelomično rastavljen adenovirus nalazi se u citoplazmi koja je bogata brojnim proteinima i organelama zbog čega adenovirus ne može pasivnom difuzijom doći do jezgre. Zato se adenovirus preko kapsidnog proteina heksona veže za motorni protein dinein koji koristi mikrotubule i nosi adenovirus prema (-) kraju mikrotubula, točnije prema središtu organizacije mikrotubula (engl. *microtubule organizing center*, MTOC) [32, 39]. U području u blizini jezgre adenovirusi se odvajaju od mikrotubula, vežu za proteine jezgre i unose svoj genetički materijal u jezgru domaćina, međutim, detaljan mehanizam ovog procesa još nije dovoljno razjašnjen [40].

Dolaskom u perinuklearno područje, djelomično rastavljen adenovirus veže se za kompleks jezgrine pore (engl. *nuclear pore complex*, NPC), kanal koji regulira prolazak tvari kroz jezgrinu ovojnicu. Budući da je prolazak kroz NPC ograničen na molekule promjera do približno 40 nm, u jezgru se unosi isključivo adenovirusna DNA vezana na proteine srži [34]. Za adenoviruse je dosad pokazano da se heksonom veže za Nup214, jedan od nukleoporina NPC-a. Dodatno, adenovirus se proteinom IX veže za motorni protein kinezin-1 koji je istovremeno vezan za druge nukleoporine NPC-a. Zbog toga što kinezin-1 putuje prema (+) kraju mikrotubula, odnosno od jezgre, stvara se sila koja omogućuje razdvajanje proteina kapside i oslobađanje virusnog genoma [41]. Dodatno, neka istraživanja u središte unosa adenovirusne DNA stavljaju protein srži VII kao faktor koji omogućuje receptorom posredovan unos virusne DNA u jezgru [42, 43]. Unesena adenovirusna DNA se ne ugrađuje u genom domaćina već ostaje episomalno, što uzrokuje prolaznu ekspresiju svih gena. Nakon započete replikacije i transkripcije sintetiziraju se virusni proteini, sklapaju novi adenovirusi, koji izlaze iz inficirane stanice [44].

Ocjena rada u tijeku

1.4. Urođeni imunosni odgovor na infekciju adenovirusom

Infekcija adenovirusom potiče urođeni imunosni odgovor stanice koji se očituje lučenjem upalnih citokina i kemokina, što predstavlja prvu liniju obrane stanice od virusne infekcije. Aktivacija urođenog imunosnog odgovora dovodi do niza promjena unutar stanice s ciljem ograničavanja replikacije virusa, privlačenja imunosnih stanica koje uklanjaju inficirane stanice te poticanja specifičnog, adaptivnog imunosnog odgovora [45].

1.4.1. Prepoznavanje adenovirusa

Adenovirusna kapsida i adenovirusna DNA prepoznaju se kao molekularni obrasci povezani s patogenima (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) koji uobičajeno nisu prisutni u stanici domaćina [46, 47]. Prepoznavanje PAMP-ova aktivira urođeni imunosni odgovor i lučenje upalnih citokina i kemokina [48]. Receptori urođene imunosti ključni za prepoznavanje PAMP-ova nazivaju se receptori za prepoznavanje uzoraka (engl. *pattern recognition receptors*; PRR), a lokalizirani su na površini stanice i unutar staničnih odijeljaka. Takva raspodjela omogućuje prepoznavanje adenovirusa u svim fazama infekcije stanice - od vezanja virusa za receptor i ulaska u stanicu, tijekom putovanja i bijega iz endosoma pa do unosa DNA u jezgru [49]. PRR-ovi koji sudjeluju u prepoznavanje virusa uključuju: i) receptore slične Toll-u (engl. *Toll-like receptor;* TLR), ii) receptore slične NOD-u (engl. *NOD-like receptors*; NLR) koji su sastavni dijelovi inflamasoma, proteinskog kompleksa uključenog u razvoj upalnog stanja te iii) niz citosolnih receptora koji prepoznaju DNA [49].

1.4.2. Receptori slični Toll-u

Najbolje istraženi PRR-ovi su receptori slični Toll-u. Obitelj TLR-ova sastoji se od 10 članova, a okarakterizirani su na različitim imunosnim i neimunosnim stanicama. Neki TLR-ovi se nalaze na površini stanice (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6), dok su drugi smješteni u membranama endosoma (TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9) [50]. Svaki TLR sadrži 3 domene: ektodomenu za prepoznavanje PAMP-ova, transmembransku domenu i citoplazmatsku TIR domenu (engl. *Toll-interleukin (IL)-1 receptor (TIR) domain;* TIR) koja prenosi signal putem

Ocjena rada u tijeku

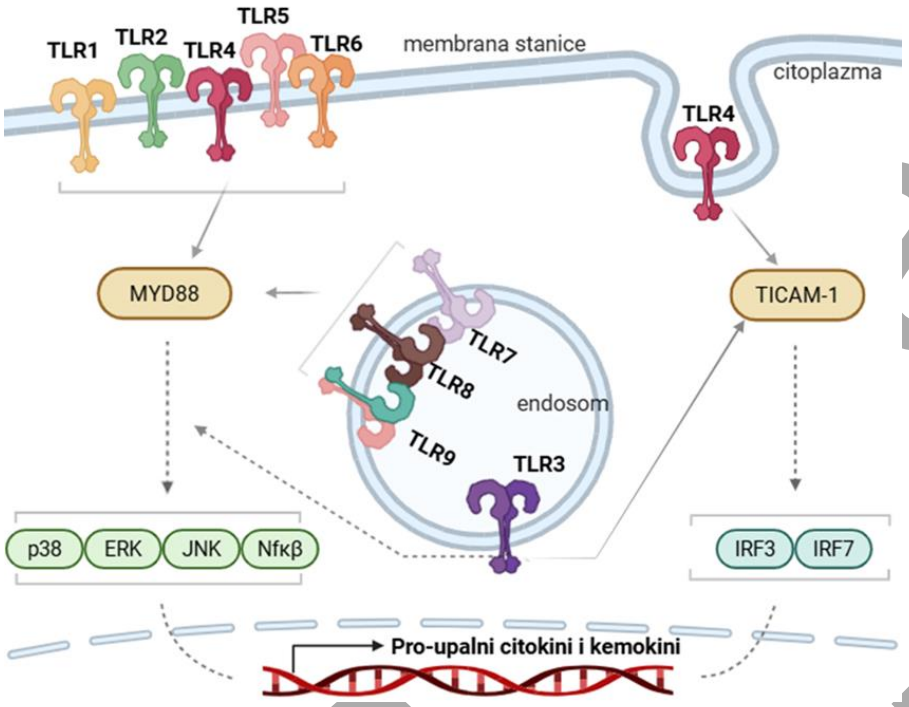
interakcije s adaptor proteinom [51]. Do sada su poznata četiri adaptora TLR-a: i) MyD88 (engl. *myeloid differentiation factor 88*), ii) TICAM-1 (engl. *TIR-domain-containing adaptor protein-inducing interferon-β*), iii) TIRAP (engl. *TIR-associated protein*) te iiii) TRAM (engl. *TRIF-related adaptor molecule*) [52]. Svi TLR-ovi, osim TLR3, regrutiraju MyD88 za prijenos signala nakon vezanja liganda. TLR3 je izuzetak jer za prijenos signala u stanicu ne koristi adaptor MyD88 već isključivo adaptor TICAM1. Poseban je i TLR4 jer koristi dva različita puta za prijenos signala, MyD88-ovisan i MyD88-neovisan kod kojeg umjesto MyD88 veže adaptor TICAM1 [53]. Poznato je da TLR3 može prepoznati jednolančane molekule RNA, a TLR4 bakterijske lipopolisaharide i virusne proteine [54].

Povezanost TLR-ova s infekcijom stanica adenovirusom potvrđena je u više znanstvenih radova. Pokazano je da TLR9, koji može prepoznati dvolančanu DNA, sudjeluje u aktivaciji urođenog imunosnog odgovora nakon infekcije adenovirusima koji za ulazak u stanicu koriste CAR ili CD46, odnosno da mogu aktivirati imunosni odgovor TLR9/MyD88 ovisnim, ali i neovisnim putem [55, 56]. Također, u *in vivo* istraživanjima pokazana je uključenost TLR2 i TLR9 u aktivaciji imunosnog odgovora potaknutog transdukcijom vektorom temeljenim na adenovirusu tipa 5 [57].

1.4.3. Prijenos signala uslijed infekcije adenovirusom

Vezanju liganda na TLR slijedi njegova dimerizacija i regrutacija adaptora [58]. Regrutacija MyD88 vodi do aktivacije nizvodnih signalnih puteva posredovanih transkripcijskim faktorom NF-κB (engl. *nuclear factor-kappa B;* NF-κB) i MAP kinazama (engl. *mitogen-activated protein kinase*; MAPK) što rezultira lučenjem različitih pro-upalnih citokina: TNFα (engl. *tumor necrosis factor alpha;* TNFα), interleukina 6 (IL6), interleukina 1 (IL1) te kemokina nužnih za privlačenje imunosnih stanica na mjesto upale poput interleukina 8 (IL8) i interleukina 4 (IL4) [52, 59]. Alternativno, regrutacija adaptora TICAM-1, primjerice kod TLR3 ili TLR4, aktivira nekanonske puteve posredovane molekulom NF-κB i interferon regulacijskim faktorima (engl. *IFN regulatory factor;* IRF) čime se potiče lučenje interferona tipa I (engl. *type I interferon;* IFN-I) (slika 4) [60].

Ocjena rada u tijeku



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz molekula uključenih u prijenos signala i aktivaciju urođene imunosti uslijed aktivacije TLR-a. Nakon prepoznavanja odgovarajućeg liganda TLR-ovi regrutiraju adaptorne proteine MyD88 ili TICAM-1, putem kojih se odvija nizvodni prijenos signala. Svi TLR-ovi, osim TLR3, vežu adaptor MyD88, što može dovesti do aktivacije transkripcijskog faktora NF-κB te MAP kinaza p38, ERK i JNK. TLR3 primarno regrutira adaptor TICAM-1 i potiče prijenos signala koji vodi aktivaciji transkripcijskih faktora IRF3 i IRF7. Alternativno, prijenos signala posredovan TLR3 može se djelomično preklapati sa putevima nizvodno od MyD88. TLR4 može prenositi signal u stanicu putem oba adaptora – MyD88 i TICAM-1. *Prilagođeno prema [61] I izrađeno u Biorender.com.*

Osim TLR-ova, važnu ulogu u aktivaciji urođene imunosti imaju i integrini, posebno oni smješteni u područjima membrane bogatim TLR-ima. Utvrđeno je da postoji međudjelovanje (engl. *cross-talk*) između integrina i TLR-ova, koje može biti sinergističko ili inhibitorno [92]. Konkretno, pokazano je da αvβ3 integrin može djelovati kao koreceptor u TLR-posredovanom prepoznavanju virusa, dodatno pojačavajući aktivaciju urođenog imunosnog odgovora [93].

Iz literature je poznato da infekcija adenovirusom potiče aktivaciju MAP kinaza ERK i p38 što dovodi do aktivacije signalnih puteve uključenih u ekspresiju upalnih citokina i kemokina [62]. MAP kinaze su obitelj proteinskih kinaza specifične za aminokiseline serin i treonin te sudjeluju u velikom broju signalnih puteva uključenih u ekspresiju gena,

Ocjena u tijeku

preživljenje stanice, ali i smrt stanice. Najbolje proučavane MAP kinase su p38, JNK (engl. *c-Jun amino (N)-terminal kinase;* JNK) i ERK (engl. *extracellucar signal-regulated kinase;* ERK). Aktiviraju se kroz kaskadu: MAP3K → MAP2K → MAPK, pri čemu dolazi do fosforilacije serinskih i tirozinskih ostataka [63]. Tako je npr. pokazano da infekcija adenovirusom tip 7 (iz grupe B) aktivira signalne puteve povezane s ekspresijom i lučenjem IL6 putem p38/ NF-κB signalizacije [64]. Osim toga, lučenje IFN-I tijekom infekcije adenovirusom povezano je s aktivacijom transkripcijskog faktora IRF3 [65].

Obitelj proteina NF-κB sastoji se od pet transkripcijskih čimbenika: p50, p52, p65, c-Rel i RelB, koji sudjeluju u regulaciji transkripcije DNA, proizvodnji citokina i preživljenju stanice. U nestimuliranim stanicama, proteini NF-κB uglavnom se nalaze u citoplazmi, gdje su vezani za inhibitore iz obitelji IκB [66]. Kanonski put aktivacije NF-κB pokreću različiti ligandi vezanjem na receptore imunosnog sustava (npr. TLR) što dovodi do brze aktivacije IKK kompleksa (IκB kinaza). Taj kompleks sastoji se od dviju katalitičkih podjedinica, IKKα i IKKβ, te regulatorne podjedinice NEMO (IKKγ). Aktivirani IKK kompleks fosforilira IκB nakon čega se oslobađa NF-κB dimer (p50/p65 ili p50/c-REL) koji zatim ulazi u jezgru i aktivira ekspresiju ciljnih gena. Naša nedavna istraživanja pokazala su da ekspresija *IL6* izazvana transdukcijom adenovirusom tipa 26 ovisi o integrinu αvβ3 te je posredovana aktivacijom transkirpcijskog faktora NF-κB [67]. S druge strane, nekanonski NF-κB put aktivira se sporije i selektivnije, preko specifičnih članova superobitelji TNF receptora (engl. *tumour necrosis factor receptor;* TNFR) kod kojeg se dimer p52/RELB translocira u jezgru i regulira ekspresiju ciljnog skupa gena [66, 68].

IRF-ovi čine obitelj transkripcijskih faktora uključenih u aktivaciju imunosnog odgovora stanice na virusnu infekciju. Među njima, IRF3 i IRF7 imaju ključnu ulogu u aktivaciji ekspresije IFN-I (IFN-α/β). IRF3 djeluje kao primarni, rani transkripcijski faktor, koji se aktivira neposredno nakon prepoznavanja virusa te pokreće ekspresiju IFN-a, dok IRF7 dodatno pojačava ovaj odgovor, ali u kasnijim fazama infekcije [60, 69].

Zaključno, aktivacija urođenog imunosnog odgovora na infekciju adenovirusom složen je proces. Započinje prepoznavanjem virusnih PAMP-ova putem različitih PRR-ova, koji se nalaze kako na površini stanice, tako i unutar nje. Budući da adenovirusi koriste različite receptore i različite načine ulaska u stanicu te se unutar nje nalaze u endosomima ili citosolu, i način aktivacije urođene imunosti može se razlikovati ovisno o tipu adenovirusa i staničnom kontekstu.

Ocjena rada u tijeku

1.5. Vektori temeljeni na adenovirusima

Adenovirusi se dugi niz godina koriste kao modeli u istraživanjima staničnih procesa poput prekrajanja mRNA (engl. *messenger ribonucleic acid;* mRNA), transkripcije i replikacije DNA ili ekspresije proteina [34, 70, 71], a najbolje istraženi adenovirusi korišteni u istraživanjima su HAdV-C2 i HAdV-C5 [44]. Dostava genetskog materijala u jezgru stanica prirodna je sposobnost virusa koju su znanstvenici usljed sve boljeg razumijevanja osnovne biologije ovog virusa naučili iskoristiti za razvoj virusnih vektora. Karakteristike dobrog vektora koje su prepoznate kod adenovirusa su: sposobnost aktiviranja urođenog i specifičnog imunosnog odgovora domaćina, visoka efikasnost dostavljenog genetičkog materijala u ciljane stanice i jednostavna proizvodnja u visokom titru, karakteristika nužna za širu primjenu kod ljudi [72]. Adenovirusni vektori se koriste kao vektori za cjepljenje i kao vektori u genskoj terapiji tumora [73-75]. Cilj korištenja adenovirusnih vektora kod cijepljenja ljudi je izazvati specifičan imunosni odgovor i omogućiti buduću zaštitu organizma, dok je kod terapije tumora cilj dostaviti genetički materijal u željene stanice, izazvati staničnu smrt, ali bez da se tijekom tog procesa izazove imunosni odgovor na adenovirusni vektor [44, 76]. Nedostatak primjene adenovirusnih vektora u liječenju ljudi je seroprevalenecija, odnosno razvijena imunost prema određenim tipovima adenovirusa uslijed ranije infekcije koja može ograničiti uspješnost adenovirusnih vektora u liječenju ljudi. Naime, neutralizirajuća protutijela prema adenovirusnom vektoru mogu smanjiti efikasnost dostave genetičkog materijala (kod genske terapije) ili nedovoljno snažno potaknuti imunosni odgovor na željeni patogen (kod vakcinacije). Zbog toga se istraživanja više preusmjeravaju s dobro proučenih, ali visoko seroprevalentnih adenovirusa (npr. HAdV-C2 ili HAdV-C5) prema slabije proučenim, ali nisko seroprevalentnim adenovirusima, kao što je adenovirus čovjeka tipa 26 [77].

1.6. Adenovirus čovjeka tipa 26

Adenovirus čovjeka tipa 26 (HAdV-D26) pripada grupi D adenovirusa, koja je ne samo najbrojnija već i najčešće povezana s infekcijama oka i probavnog sustava čovjeka [31]. Njegova struktura određena je krioelektronskom mikroskopijom gdje je pokazano da se

Ocjena rada u tijeku

HAdV-D26 ne razlikuje značajno od HAdV-C5, osim po duljini vlakna koje je kod HAdV-D26 gotovo 3 puta kraće u odnosu na vlakno HAdV-C5 [10]. Prirodni tropizam HAdV-D26 još nije u potpunosti razjašnjen te je pokazano da se ovaj virus može vezati na različite receptore na površini stanice. Primjerice, u epitelnim stanicama može se vezati na *de novo* eksprimiran receptor CD46, iako slabijim afinitetom nego adenovirusi iz grupe B [77]. Također, u perifernim stanicama krvi potvrđena je ovisnost ulaska HAdV-D26 o prisutnosti CD46 [78]. HAdV-D26 se može vezati i na receptor CAR, no slabijim afinitetom u usporedbi s HAdV-C5 [79]. Uz to, pokazano je da HAdV-D26 može koristiti i sijalinsku kiselinu kao receptor za ulazak u stanice [80].

U prethodnim istraživanjima provedenima u našoj istraživačkoj grupi utvrđeno je da je za učinkovitu transdukciju epitelnih stanica HAdV-D26 ključan integrin αvβ3, dok prisutnost CAR-a i CD46 nije utjecala na učinkovitost transdukcije. Također, pokazano je da HAdV-D26 kolokalizira s integrinom αvβ3 te da povećana ekspresija ovog integrina potiče veću internalizaciju virusa. Ovi rezultati upućuju na to da HAdV-D26 koristi integrin αvβ3 kao funkcionalni receptor za transdukciju epitelnih stanica [81]. Dodatnim istraživanjima opisani su mehanizmi ulaska HAdV-D26 u dvije stanične linije: A549 na čijoj površini je mala količina integrina αvβ3 te A549-E6, klonu stanica A549 s pojačanom ekspresijom integrina αvβ3. Pokazano je da transdukcija HAdV-D26 u stanicama A549 djelomično ovisi o dinaminu-2, ne ovisi o kaveolinu-1, a uključuje klatrin na razini receptora. Naime, smanjenje klatrina dovodi do povećane ekspresije αvβ3 integrina, što rezultira uspješnijom transdukcijom virusa. S druge strane, u stanicama A549-E6 transdukcija djelomično uključuje dinamin-2 i ovisi o kaveolinu-1, što ukazuje da je kaveolin-1 ograničavajući faktor u transdukciji HAdV-D26 posredovanoj integrinom αvβ3. Dodatno, pokazano je da inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze dovodi do povećanog vezanja i internalizacije HAdV-D26, iako ne mijenja količinu integrina αvβ3 na površini stanice [82].

1.6.1. Vektori za cijepljenje temeljeni na adenovirusu tipa 26

Vektori temeljeni na adenovirusima zbog snažne, ali prolazne ekspresije transgena posebno su pogodni za vakcinaciju, pri čemu su HAdV-C5 i HAdV-D26 među najčešće korištenima [83]. HAdV-D26 pripada u kategoriju adenovirusa niske seroprevalencije što mu daje prednost u odnosu na HAdV-C5. U pretkliničkim istraživanjima je pokazano da

Ocjena rada u tijeku

cjepiva temeljena na HAdV-D26 potiču raznolik i snažan antigen-specifičan humoralni i stanični imunosni odgovor [84-86]. Dodatno, u usporedbi s HAdV-C5, HAdV-D26 potiče snažniji urođeni imunosni odgovor koji je praćen upalnim citokinima i kemokinima, što može dodatno pojačati specifičan imunosni odgovor na cjepivo. Uz to, neutralizacijska protutijela prema HAdV-C5 ne utječu na imunosni odgovor kod ljudi koji su primili cjepiva temeljena na HAdV-D26 [86, 87].

Prvo cjepivo temeljeno na vektoru HAdV-D26 koje je dobilo odobrenje za uporabu na području Europske unije bilo je cjepivo protiv Ebole (engl. *European Medicines Agency*; *https://www.ema.europa.eu/en*). Važnost vektora temeljenog na HAdV-D26 dodatno je potvrđena tijekom pandemije virusom SARS-CoV-2 (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2;* SARS-CoV-2) kada su dva cjepiva temeljena na HAdV-D26 odobrena za upotrebu - cjepivo *Janssen* tvrtke *Johnson & Johnson* te rusko cjepivo *Sputnik V* koje se temelji na kombinaciji vektora HAdV-C5 i HAdV-D26 (EMA-*https://www.ema.europa.eu/en, https://covid19.who.int/).* S obzirom na to da adenovirusni vektori tijekom infekcije potiču aktivaciju urođene imunosti koja se razlikuje ovisno o vrsti stanice i tipu HAdV, razumijevanje mehanizama aktivacije imunosnog odgovora važno je za procjenu upotrebe i sigurnosti vektora temeljenih na HAdV [45].

1.7. Endocitoza

Endocitoza je zajednički naziv za procese unošenja krutih i tekućih čestica u stanicu uvrnućem membrane stanice. Osim što omogućava unos hranjivih tvari, endocitoza ima ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti membranskih proteina, staničnoj diobi i pokretljivosti stanice [88]. S obzirom na veličinu internaliziranih čestica, endocitoza se dijeli na fagocitozu – proces specifičan za određene tipove stanica kojim se unose veće čestica, i pinocitozu – proces unosa manjih čestica otopljenih u izvanstaničnoj tekućini. Pinocitoza je općenito prisutna u svim eukariotskim stanicama, a dalje se klasificira na makropinocitozu i endocitozu posredovanu receptorom [89]. Dok je makropinocitoza nespecifičan proces kojim stanica unosi male količine izvanstaničnog materijala putem mjehurića zvanih makropinosomi, endocitoza posredovana receptorom zahtijeva specifičnu interakciju liganda i receptora te uključuje koordinaciju različitih proteina i lipida [90]. Unatoč uključenosti različitih proteina, sve vrste endocitoza posredovanih receptorima slijede

Ocjena rada u tijeku

nekoliko zajedničkih koraka: i) specifično vezanje liganda za receptor na površini stanice, ii) uvrnuće stanične membrane i oblikovanje endocitoznog mjehurića, te iii) odvajanje mjehurića od membrane i njegovo putovanje unutar stanice [89]. Osim što je za stanicu neophodna, endocitoza služi i virusima kako bi ušli u stanicu. U kontekstu adenovirusa najbolje su istražene dvije vrste endocitoza posredovane receptorom koje adenovirus koristi: klatrinom-posredovana endocitoza i kaveolinom-posredovana endocitoza [91].

Kaltrinom-posredovana endocitoza događa se na područjima stanične membrane gdje kompleks adaptorskog proteina AP-2 (engl. *adaptor protein 2 complex*) istovremeno prepoznaje fosfatildilinozitol fosfolipide (engl. *phosphatidylinositol phospholipids*; PIPs), točnije fosfatidilinozitol-4,5-bifosfate (PI(4,5)P2) koji se nalaze u membrani stanice te receptor na koji se vezao ligand (npr. adenovirus). Uz pomoć dodatnih proteina, AP-2 posreduje formiranje mjehurića obloženog klatrinom [92]. Klatrin se u tom procesu na mjehurić veže u obliku triskeliona koji sadržava tri laka i tri teška lanca, tvoreći pritom stabilnu, ali fleksibilnu klatrinsku rešetku. Osim klatrina, i drugi proteini važni su za oblikovanje mjehurića, a mogu se vezati na klatrin, AP-2 ili membranu preko PI(4,5)P2. To su primjerice Epsin (engl. *Eps15-interacting protein*) i AP180/CALM (engl. *clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein*) koji vežu klatrin te sudjeluju u savijanju membrane te Eps15 koji je važan za prepoznavanje receptora [91]. Reorganizacija aktinskog citoskeleta neophodna je za formiranje mjehurića, a proces završava djelovanjem dinamina-2, proteina koji odvaja mjehurić od membrane nakon čega klatrinska rešetka disocira [93]. Ovisno o tipu receptora na koji se vezao ligand i sastavu membrane, tako formirani mjehurić usmjerava se prema različitim odredištima u stanici [89]. Kaveolinom-posredovana endocitoza započinje na uvrnutim dijelovima stanične membrane poznatim kao kaveole koje su bogate sfingolipidima i kolesterolom [94, 95]. Kaveole su građene od tri tipa proteina, među kojima je kaveolin-1 najvažniji za njihovo formiranje. Nakon internalizacije, mjehurići obloženi kaveolinom mogu se spajati u veće strukture – kaveosome, a za razliku od klatrina, kaveolin ostaje povezan s mjehurićem i nakon odvajanja od membrane [90, 96]. Za ulazak HAdV-C5 i HAdV-C2 u epitelne stanice pokazano je korištenje klatrinom-posredovane endocitoze. Suprotno tome, HAdV-C5 u plazmocite ulazi putem kaveolinom-posredovane endocitoze, a u dendritičke stanice makropinocitozom [97, 98] što upućuje na to da adenovirus za ulazak u stanicu može koristiti sve tipove endocitoze.

Ocjena rada u tijeku

Endosomalna mreža čini složen, dinamičan i međusobno povezan sustav čija je funkcija prikupljanje, sortiranje i daljnje usmjeravanje internaliziranog receptora, kao i prijenos informacija prema drugim staničnim odredištima. Nakon internalizacije, primarni endocitozni mjehurići prolaze međusobne fuzije i formiraju rane endosome gdje se odvija primarna odluka o daljnjoj sudbini receptora. Ovisno o specifičnim signalima i vremensko-prostornoj regulaciji unutar endosomalne mreže, receptor može biti: i) recikliran natrag na staničnu membranu, ii) usmjeren na razgradnju u kasnim endosomima/lizosmima ili iii) transportiran retrogradno u trans-Golgijevu mrežu (engl. *trans-Golgi network*; TGN), čime se potencijalno izbjegava njegova razgradnja i odlučuje daljnja preraspodjela unutar stanice [99-102].

Svaki endosom unutar endosmalne mreže ima svoj proteinski identitet, no on se s vremenom mijenja kroz proces poznat kao sazrijevanje endosoma. Najvažniji mehanizmi tijekom sazrijevanja ranog endosoma u kasni endosom su zakiseljavanje lumena endosoma, promjene u sastavu fosfatidilinozitol fosfolipida u membrani, kao i regrutacija i aktivacija proteina Rab [103, 104].

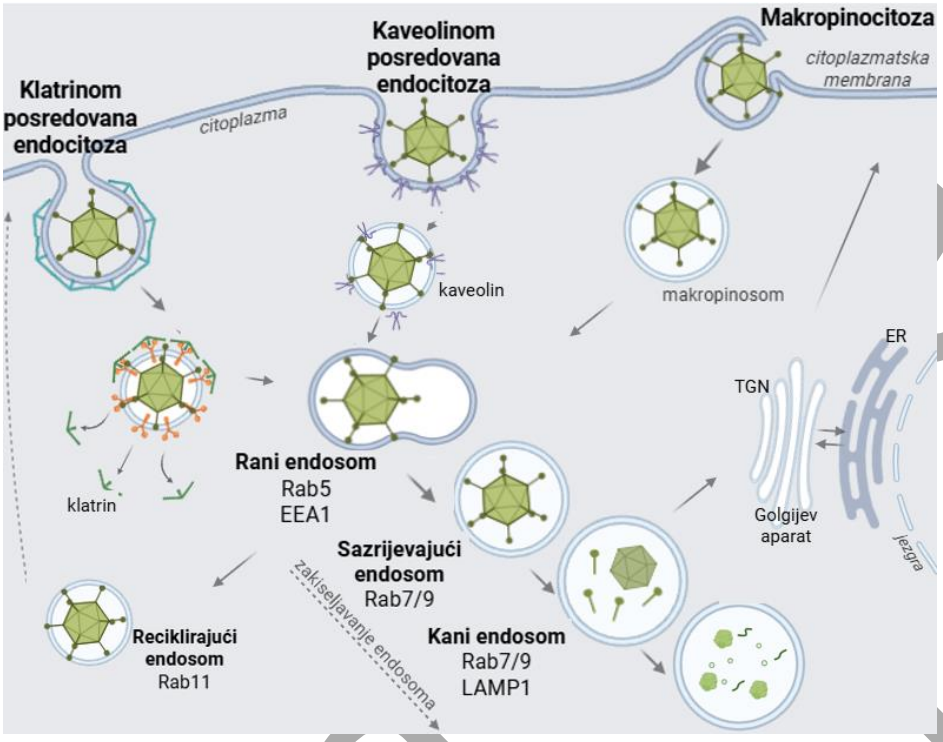
Rab proteini su GTP-aze (engl. *guanine triphosphatases*; GTPases), koje pripadaju superobitelji Ras i imaju ključnu ulogu u procesima povezanim s kretanjem i usmjeravanjem endosoma unutar stanice [105]. Rab proteini se u stanici nalaze u aktivnom i neaktivnom obliku, a izmjena tih stanja moguća je zbog GTP-azne aktivnosti. Naime, Rab proteini funkcioniraju kao molekularni prekidači i ciklički prelaze između neaktivnog (GDP-vezanog) i aktivnog (GTP-vezanog) oblika. Budući da Rab proteini imaju nisku sposobnost samostalne izmjene nukleotida i hidrolize GTP-a, potrebni su im pomoćni proteini za pravilno funkcioniranje. Glavnu ulogu u tom procesu imaju GDP-GTP izmjenjujući faktori, GEF-ovi (engl. *GTP-ase exchange factor*; GEF) koji vrše izmjenu GDP-a u GTP, dok hidrolizu GTP-a natrag u GDP kataliziraju GAP-ovi (engl. *GTPase-activating proteins*; GAP). Aktivni proteini Rab lokalizirani su u ciljnim dijelovima membrane endosoma i specifično vežu proteine efektore čime nastaju proteinski kompleksi koji određuju identitet endosoma te reguliraju daljnje formiranje, usmjeravanje i fuziju vezikula. Uslijed vezanja za inhibitor disocijacije GDP-a, GDI-a (engl. *GDP Dissociation Inhibitor*; GDI) Rab izlazi iz lipidnog dvosloja u citosol i prelazi u neaktivno stanje. Interakcija Rab-GDP-a s GDI-om osim što stabilizira kompleks, sprječava i preranu aktivaciju proteina Rab. Kada se Rab-GDI kompleks približi membranskom mjestu djelovanja, GEF katalizira disocijaciju GDI-a i zamjenu GDP-a

Ocjena rada u tijeku

s GTP-om, čime Rab prelazi u aktivno stanje, veže se za membranu i ponovno može vezati proteine efektore [106].

S obzirom na uključenost Rab proteina, pH vrijednost lumena endosoma i funkcionalnu ulogu, endosomi se mogu podijeliti na reciklirajuće, rane, sazrijevajuće i kasne endosome/lizosome. Rani endosomi obilježeni su proteinom Rab5 i višim vrijednostima pH u odnosu na kasne endosome/lizosome za koje je karakterističan protein Rab9 te niže pH vrijednosti [107, 108]. Sazrijevajući endosomi su prijelazni oblik između ranog i kasnog endosoma, a istovremeno su obilježeni proteinom Rab7 i Rab9 [109]. Protein Rab11 sudjeluje u recikliranju receptora na staničnu membranu te se smatra markerom reciklirajućih endosoma [110]. Regulacija aktivnosti Rab proteina usko je povezana i s fosfatidilinozitol fosfolipidima, važnim lipidnim komponentama endosomalnih membrana. Proteini koji kontroliraju aktivaciju i deaktivaciju Rab GTPaza, GEF-ovi i GAP-ovi, mogu se regrutirati na ciljne membrane putem interakcije s određenim fosfatidilinozitol fosfolipidima. Osim toga, i efektorski proteini koje aktivirani Rab proteini regrutiraju sadrže domene koje specifično prepoznaju i vežu te lipide. Primjer takvog efektora je EEA1 (engl. *Early Endosomal Antigen 1*), dobro okarakterizirani marker ranih endosoma, koji se domenom veže za PI(3)P i pospješuje fuziju endosoma [111, 112]. Kasni endosomi/lizosomi također imaju svoj jedinstveni proteinski identitet, koji je osim Rab9 proteinom obilježen i stalno prisutnim membranskim proteinom LAMP1 (engl. *Lysosome-Associated Membrane Protein 1*) (Slika 5) [113].

Ocjena rada u tijeku



Slika 5. Shematski prikaz potencijalnog putovanja adenovirusa kroz mrežu endosoma. Sazrijevanje endosoma praćeno je smanjenjem pH vrijednosti u njihovom lumenu te izmjenom sastava proteina. Rab5 i EEA1 karakteristični su za rane endosome, dok su Rab7 i Rab9 obilježja sazrijevajućeg endosoma. Kasni endosom/lizosom obilježeni su s Rab7, Rab9, i membranskim proteinom LAMP1. Adenovirus koji ne uspije pobjeći iz endosoma zadržava se u kasnom endosomu i moguće biva razgrađen. *Prilagođeno prema [114] i izrađeno u BioRender.com.*

Zaključno, unutarstanično kretanje molekula unesenih endocitozom ovisi o koordinaciji Rab GTPaza, njihovih regulatora i lipidnih komponenti endosomalnih membrana. Adenovirusi različitih skupina ulaze u endosomalne puteve drugačijeg proteinskog sastava, što može utjecati na njihovu unutarstaničnu sudbinu i uspješnost infekcije.

Ocjena u tijeku

Ocjena rada u tijeku

2. Cilj istraživanja

Korištenjem adenovirusnih vektora niske seroprevalencije, poput HAdV-D26, moguće je zaobići postojeći imunitet kod većine svjetske populacije razvijen prema trenutno najbolje istraženom vektoru HAdV-C5. Iako je HAdV-D26 pokazao vrlo dobre rezultate u *in vivo* modelima, njegova osnovna biologija još uvijek nije u potpunosti istražena.

Naši prethodni rezultati pokazali su da HAdV-D26 u stanice A549 i A549-E6, koje se razlikuju po količini eksprimiranog integrina αvβ3, ulazi na različit način. Dodatno, inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze u stanicama A549 rezultirala je povećanim vezanjem i internalizacijom HAdV-D26, bez promjene u količini integrina αvβ3 na površini stanice. Preliminarni rezultati također pokazuju da inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze zadržava HAdV-D26 u blizini membrane stanice.

S obzirom da su prethodna istraživanja pokazala značajnu ulogu integrina αvβ3 u uspješnosti transdukcije HAdV-D26 u stanicama epitela čovjeka te znajući da različiti tipovi adenovirusa pokazuju različiti ulazak i unutarstanično putovanje ovisno o receptorima na koje se vežu, postavljena je hipoteza da kretanje HAdV-D26 kroz različite endosomalne odjeljke može utjecati na urođeni imunosni odgovor domaćina.

Integrin αvβ3 smješten je u području lipidnih splavi, mjestu lokalizacije brojnih TLR-a, pa se može očekivati njegova uloga u aktivaciji urođene imunosti. Pretpostavka je da bi različito unutarstanično putovanje HAdV-D26, bilo zbog korištenja integrina αvβ3 kao receptora ili zbog inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze, moglo uzrokovati zadržavanje virusa u različitim endosomalnim odjeljcima. Tako bi virus vremenski i prostorno bio izložen drugačijim staničnim senzorima u odnosu na uvjete neometanog ulaska i putovanja i potaknuo bi drugačiji urođeni imunosni odgovor. Do sada nisu poznata istraživanja u kojima se opisuje povezanost unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 i aktivacije urođenog imunosnog odgovora.

Na temelju navedenog, **cilj ove doktorske disertacije je istražiti hoće li promjena endocitoze i unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 utjecati na aktivaciju ranog urođenog imunosnog odgovora u stanicama epitela čovjeka.**

Rezultati dobiveni tijekom izrade ove doktorske disertacije pridonijet će boljem razumijevanju osnovne biologije HAdV-D26 i poslužiti kao znanstvena podloga za razvoj učinkovitijih i sigurnijih vektora temeljenih na HAdV-D26 za terapijsku primjenu kod ljudi.

Ocjena rada u tijeku

3. Materijali i metode

Ocjena rada u tijeku

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Osnovne kemikalije korištene u eksperimentima

Kemikalija	Proizvođač	Kemikalija	Proizvođač
agaroza	Sigma-Aldrich, Njemačka	akrilamid	Sigma-Aldrich, Njemačka
Alexa Fluor 488 5-TFP	Thermo Fisher Scientific, SAD	amidocrno	Kemika, Hrvatska
amonijev klorid (NH_4Cl)	Sigma-Aldrich, Njemačka	amonijev persulfat, APS	Serva, Njemačka
beta-merkaptoetanol	Fluka, Njemačka	bisakrilamid	Serva, Njemačka
bromfenolno plavilo (engl. *bromophenol blue*)	Serva, Njemačka	BSA (albumin seruma goveda; engl. *bovine serum albumine*)	Carl Roth, Njemačka
cezijev klorid ($CsCl_2$)	Sigma-Aldrich, Njemačka	DAPI Fluoromount G	Southern Biotech, SAD
deionizirana voda (diH2O)		DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)	Sigma-Aldrich, Njemačka
DMSO (dimetilsulfoksid)	Sigma-Aldrich, Njemačka	faloidin (Phalloidin Alexa Fluor 555)	Cell Signaling
etanol	GramMol, Hrvatska	glicerol	Kemika, Hrvatska
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, SAD	mlijeko u prahu, nemasno	Carl Roth, Njemačka
DTT (Ditiotreitol)	Sigma-Aldrich, SAD	*Pierce ECL Western Blotting Substrate*	Thermo Fisher Scientific, SAD
fosfatni pufer bez Ca^{2+} i Mg^{2+} (PBSΔ) (engl. *phosphate buffered saline*, PBS)	Sigma-Aldrich, SAD	SDS (natrij-dodecil sulfat)	Sigma-Aldrich, SAD
DharmaFECT transfekcijski reagens	Horizon Discovery, UK	standard za elektroforezu u gelu	Thermo Fisher Scientific, SAD
HEPES	Merck Milipore, Njemačka	Midori Green, boja za agarozni gel	NIPPON Genetics EUROPE,Njemačka
Orange G	Merck Milipore, Njemačka	TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilendiamin)	Sigma-Aldrich, SAD

Ocjenski rad

EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina)	Kemika, Hrvatska	Triton X–100	Sigma-Aldrich, SAD
paraformaldehid (PFA)	Merck Milipore, Njemačka	Tris-HCl	Merck Millipore, Njemačka
Tween–20	Sigma-Aldrich, SAD	N,N,N,N-tetrametiletilenediamin, TEMED (C6H16N2)	Sigma-Aldrich, SAD
Tris baza	Sigma-Aldrich, SAD	Tripsin	Sigma-Aldrich, SAD
Power SYBR Green PCR Master Mix, mješavina reagensa za PCR	Applied Biosystems,SAD		

3.1.2. Puferi i otopine

Osnovne otopine i puferi te načini njihove pripreme navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Osnovne otopine i puferi korišteni u eksperimentima

Otopina	**Priprema**
$PFA_{4\%}$/PBS	10 g PFA i 100 µL NaOH otopi se u 1000 mL PBS, čuva se pri -20°C
$PFA_{2\%}$/PBS	$PFA_{4\%}$/PBS u PBS u omjeru 1:1
Pufer TAE (50x)	242 g Tris baza, 57.1 mL ledene octene kiselina, 100 mL 0.5 M, pH 8.0, otopiti u 1 L diH_2O
Pufer TD	8 g NaCl i 0.38 g KCl otopi se u 150 mL diH_20, doda se 0.1 g Na_2HPO_4 i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH_20, podesi pH 7.4-7.5, nadopuni do 1 L s diH_20; sterilizira se autoklaviranjem
Otopina CsCl gustoće 1,25 g/mL	36,16 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Otopina CsCl gustoće 1,34 g/mL	51,20 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
Otopina CsCl gustoće 1,40 g/mL	62,00 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
DMEM-$FBS_{10\%}$	500 mL FBS u 5000 mL DMEM
DMEM-$FBS_{0.2\%}$	10 mL FBS u 5000 mL DMEM
10x TBS	500 mL Tris-HCl (pH 7,5) + 300 mL 5 M NaCl + 200 mL diH_2O, čuva se pri 4°C
Pufer TBST	50 mL pufera 10x TBS + 450 mL diH_2O + 450 µL Tween-20
akrilamid/bisakrilamid 30%	29,2 g akrilamida i 0.8 g bisakrilamida otopi se u 100 mL diH_2O

Osjena rada

APS, 10 %	500 mg APS-a otapa se u 5 mL diH_2O, čuva se pri –20°C
6X SB pufer (engl. *sample buffer*; za SDS-PAGE)	1.2 g SDS otopi se u 2 mL diH_2O, doda se 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 6.8 i 30 mg Bromfenol plavila, nakon što se otopi doda se 3 mL glicerola i 1.2 mL β-merkaptoetanola. Dopuni se do 10 mL diH_2O i čuva pri –20°C
amidocrno boja, 0,1 %	45 mL metanola, 10 mL octene kiseline, 45 mL vode, 0,1 g amidocrno otopine u 100 mL
Otopina za odbojavanje	40 mL metanola, 7 mL octene kiseline, 53 mL vode
Pufer Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	6 g Tris-HCl otopi se u 80 mL diH_2O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, nadopuni se diH_2O do 100 mL, čuva se pri 4°C
Pufer Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M)	18.2 g Tris-HCl otopi se u 100 mL diH_2O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, čuva se pri 4°C
Pufer Tris-glicin	24 g Tris baza, 114 g glicina, 10 g SDS, pH 8.3
Pufer PS	10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS
pufer za uklanjanje vezanih protutijela za membranu (eng. *stripping buffer*)	100 mM otopina glicina u diH2O, pH 2,8
transfer pufer	50 ml Tris-glicinski pufer pH 8,3, 350 ml diH2O, 100 ml etanol
Hipotonična otopina (MLIM1)	10 mM HEPES (Ph 7.5), 10 mM NaCl, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2x6H_20$

3.1.3. Stanične linije

U izradi ove doktorske disertacije korištene su komercijalno dostupne stanične linije iz *American Type Culture Collection* (ATCC, SAD), A549 (ATCC CCL-185) i HEK-293 (ATCC-CRL 1573). Dodatno, korištena je i stanična linija A549-E6, klon stanica A549 koji ima povećanu količinu integrina αvβ3, a koji je ranije konstruiran u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala [81]. Stanice su uzgajane u uvjetima rasta prema preporuci dobavljača.

3.1.4. Replikacijski defektni adenovirusni vektori

Adenovirusni vektori korišteni u radu, HAdV-C5 i HAdV-D26, ranije su konstruirani [77] i dobiveni suradnjom s dr.sc. Jeromeom Custersom (Janssen Vaccines & Prevention B.V., Leiden, Nizozemska). Oba adenovirusna vektora replikacijski su defektna i kao transgen imaju ugrađen zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP). Vektori

Ocjenski rad u tijeku

su umnoženi u HEK-293 stanicama i pročišćeni centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu cezijevog klorida.

3.1.5. Kompleti kemikalija

Kompleti kemikalija korišteni u eksperimentima navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Kompleti kemikalija

Komplet	Kataloški broj	Proizvođač
QIAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Njemačka
High Pure RNA Isolation Kit	11828665001	Roche, SAD
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Applied Biosystems, SAD
Human IL-6 Uncoated ELISA	88-7066-88	Invitrogen, SAD
Human IL-8 Uncoated ELISA	88-8086-88	Invitrogen, SAD

3.1.6. Protutijela

Korištena protutijela navedena su u Tablici 5.

Tablica 5. Korištena protutijela za western blot (WB) i imunofluorescenciju (IF)

Protutijelo	Proizvedeno u organizmu	Razrjeđenje	Kataloški broj	Proizvođač
Primarna protutijela				
ERK	zec	1:200 za WB	sc-94	Santa Cruz Biotechnology, SAD
pERK	miš	1:200 za WB	sc-7383	Santa Cruz Biotechnology, SAD
p38	zec	1:200 za WB	sc-535	Santa Cruz Biotechnology, SAD
pp38	miš	1:200 za WB	sc- 166182	Santa Cruz Biotechnology, SAD
MyD88	miš	1:50 za WB	sc-74532	Santa Cruz Biotechnology, SAD
NF-κB p65	miš	1:1000 za IF	L8F6	Cell Signaling, SAD
IRF-3	zec	1:1000 za IF	D6I4C	Cell Signaling, SAD
EEA1	zec	1:100 za IF	#2411	Cell Signaling, SAD
LAMP1	zec	1:250 za IF	ab24170	Abcam, UK
Rab5	zec	1:1000 za WB 1:200 za IF	#3547	Cell Signaling, SAD
Rab7	zec	1:1000 za WB 1:100 za IF	#9367	Cell Signaling, SAD

Ocjena rada

Rab9A	zec	1:1000 za WB	D52G8	Cell Signaling, SAD
Sekundarna protutijela				
protu-zec IgG obilježeno s Alexa Fluor 647	koza	1:1000 za IF	4414S	Cell Signaling, SAD

3.1.7. Kemijski inhibitori

Korišteni kemijski inhibitori navedeni su u Tablici 6. Otopine su pripremljene otapanjem liofiliziranih inhibitora u DMSO-u. Otopine su čuvane prema uputama dobavljača. Finalne koncentracije korištenih spojeva dobivene su otapanjem u hranjivoj podlozi DMEM-$FBS_{0.2\%}$.

Tablica 6. Korišteni kemijski inhibitori

Inhibitor	**Pripremljeni u koncentraciji**	**Finalna koncentracija**	**Kataloški broj**	**Proizvođač**
Pitstop 2	30 mM	20 µM	ab120687	Abcam, UK
Adezmapimod (SB 203580)	30 mM	100 µM	152121-47-6	MedChemExpress, SAD
TAK-242 (CLI-095)	2.7 mM	0,5 µM	Tlr4-cli95-4	Invivogene, France

3.1.8. Početnice

Korištene početnice navedene su u Tablici 7. Otopine početnica pripremljene su otapanjem liofiliziranih početnica u diH_2O bez nukleaza, u koncentraciji 100 µM. Radne otopine početnica pripremljene su daljnjim razrjeđivanjem u diH_2O bez nukleaza do konačne koncentracije 10 µM. Otopine početnica su čuvane pri -20°C.

Tablica 7. Korištene početnice

Početnice za gen	**Slijed nukleotida u smjeru 5' – 3'**
IL-6	F: CAATGAGGAGACTTGCCTGG R: GCACAGCTCTGGCTTGTTCC
IL-8	F: GTTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTC R: ATGAAGTGTTGAAGTAGATTTGCTTG
CMV	F: TGGGCGGTAGGCGTGTA R: CGATCTGACGGTTCACTAAACG

Ocjenska rada u tijeku

GAPDH	F: AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG R:TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA
TICAM-1	F: CAGGAGCCTGAGGAGATGAG R: CTGGGTAGTTGGTGCTGGTT

3.1.9. Male interferirajuće RNA (siRNA)

Korištene male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) navedene su u Tablici 8. Otopine siRNA pripremljene su otapanjem liofiliziranih siRNA u diH_2O u koncentraciji 100 µM. Radne otopine siRNA pripremljene su daljnjim razrjeđivanjem diH_2O do konačne koncentracije 10 µM. Otopine siRNA su čuvane pri -20°C.

Tablica 8. Korištene siRNA molekule

siRNA	Kataloški broj	Proizvođač
MyD88	4390825	Ambion, SAD
TICAM-1	12352203	Sigma-Aldrich, Njemačka
Rab5	EHU053901-20UG	Sigma-Aldrich, Njemačka
Rab7	EHU053221-20UG	Sigma-Aldrich, Njemačka
Rab9	EMU171281-20UG	Sigma-Aldrich, Njemačka
negativna kontrola (*Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA*)	4390844	Ambion, SAD

3.1.10. Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali

Korišteni uređaji navedeni su u Tablici 9., a laboratorijski pribor i ostali materijali u Tablici 10.

Tablica 9. Korišteni uređaji

Uređaj	Proizvođač
analitička vaga AB54-S	Mettler Toledo Classic
centrifuga za mikroeprevute (do 14000 × g)	Eppendorf, Njemačka
centrifuga za stanice (do 12568 × g) Labofuge 400	Heraeus, Njemačka
inkubator za uzgoj kulture stanica	Heraus, Njemačka
Invertni svjetlosni mikroskop	Opton, Njemačka
izvor napajanja za elektroforezu proteina i transfer PowerPac Basic	BioRad, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
kadica za elektroforezu i transfer proteina	BioRad, SAD
konfokalni mikroskop Leica TCS SP8 X	Leica Microsystems, Njemačka
kupelj JB Nova	Grant Instruments, UK

Ocjena rada u tijeku

magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija
nanodrop	Thermo Fischer Scientific, SAD
vorteks EV 102	Tehtnica, Slovenija
Spektrofotometar - Tecan Infinite 2000 Pro	Tecan Group Ltd., Švicarska
termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
ultracentrifuga optima XL-100K	Beckman, SAD
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom Ultrasonic Processor	ColeParmer, SAD
uređaj za *Real-Time* PCR StepOnePlusTM Real-Time PCR System	Thermo Fischer Scientific, SAD
uređaj za vizualizaciju gelova s RNA Transiluminator TCX20M	Vilber, Njemačka
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala ChemiDoc Imaging System	BioRad, SAD

Tablica 10. Korišteni laboratorijski pribor i drugi materijali.

Pribor/materijali	**Proizvođač**
ampule za smrzavanje stanica	Nunc, Danska
aparatura za izlijevanje gela i za vertikalnu elektroforezu proteina Mini-PROTEAN® *Tetra Cell Systems*	BioRad, SAD
automatska pipeta	Integra Biosciences, SAD
epruvete za centrifugiranje Ultra-Clear 344059	Beckman, SAD
gumena strugalica (engl. *policeman*)	Falcon Becton Dickinson, SAD
Hamilton igla	Hamilton, Švicarska
kolona Sephadex G25M	GE Healtcare Life Sciences, UK
kolone Zeba Spin Desalting Columns 7K MWCO	Thermo Fisher Scientific, SAD
mikroepruvete	Eppendorf, Njemačka
nastavci za mikropipete s filtrom i bez filtra	Eppendorf, Njemačka
nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Amersham Pharmacia Biotech, Švedska
pločice MicroPlate High Binding, Transp. 96-Well, 675061	Greiner Bio-One, Austrija
posude za uzgoj kulture stanica svih formata	Falcon Becton Dickinson, SAD
stakalca za konfokalni mikroskop	Vitrognost, Hrvatska

3.1.11. Računalni programi

Računalni programi korišteni u radu navedeni su u Tablici 11.

Tablica 11. Korišteni računalni programi

Ime računalnog programa	**Verzija**	**Izdavač**
Leica Application Suite (LAS) X	3.3.0.16799	Leica Microsystems, Njemačka
Image J	1.52.i	National Institutes of Health, SAD

Microsoft Office Professional Plus 2019	16.0	Microsoft Office, SAD
GraphPad Prism	9.0	GraphPad Software, SAD

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj staničnih linija

Sve stanične linije koje su korištene za izradu ove doktorske disertacije su adherentne, što znači da rastu pričvršćene za dno posude. Stanice A549, A549-E6 i HEK-293 uzgajaju se u hranjivoj podlozi (DMEM-$FBS_{10\%}$) u inkubatoru za uzgoj kultura stanica, u kojem se održavaju stalna temperatura zraka (37°C), udio CO_2 (5%) i atmosfera zasićena vlagom dok se za tretman stanica inhibitorima ili transdukciju stanica HAdV-D26 koristi hranjiva podloga sa smanjenim udjelom seruma (DMEM-$FBS_{0.2\%}$) S ciljem dugotrajnog čuvanja, stanice se podvrgavaju procesu smrzavanja. Nakon odvajanja od podloge, stanice se centrifugiraju (10 min; 1000 x g), supernatant se uklanja, a preostali talog stanica resuspendira u hranjivoj podlozi uz dodatak krioprotektora DMSO-a (5% volumnog udjela). Tako pripremljene stanice pohranjuju se u ampule za smrzavanje, najprije na ledu (30 min), a zatim na prstenu spremnika s tekućim dušikom (24 h), gdje se proces smrzavanja odvija polako, u parama tekućeg dušika. Sljedeći dan, ampule se premještaju u tekući dušik (-196°C). Po potrebi, smrznute stanice mogu se odmrznuti uranjanjem ampula u vodenu kupelj (37°C) i resuspendiranjem u hranjivoj podlozi. Nakon inkubacije (24 h), hranjiva podloga se mijenja kako bi se u potpunosti uklonio zaostali DMSO koji može imati toksično djelovanje. Stanična kultura rasađuje se u nove posude u određenim vremenskim intervalima (svaka 2-3 dana), prije nego što stanice prerastu površinu za rast ili iscrpe sastojke hranjive podloge. Proces rasađivanja stanica započinje uklanjanjem hranjive podloge. Nakon toga, stanice se ispiru PBSΔ-om, a zatim se dodaje tripsin kako bi se omogućilo odvajanje stanica od podloge za rast. Taj proces može se pratiti svjetlosnim mikroskopom, gdje su vidljive promjene oblika stanica i njihovo odvajanje od podloge. Djelovanje tripsina zaustavlja se dodatkom hranjive podloge, a nakon resuspendiranja, stanice se nasađuju u nove posude za uzgoj.

Ocjena rada u tijeku

3.2.2. Umnažanje i pročišćavanje HAdV-D26 centrifugiranjem u cezijevom kloridu

Umnažanje replikacijski defektnih adenovirusnih vektora provodi se u stanicama HEK-293, u čiji je genom stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma. Za preparaciju HAdV26, stanice HEK-293 namnažaju se u 120 Petrijevih zdjelica (promjera 10 cm) i inficiraju suspenzijom HAdV-D26. Transducirane stanice uzgajaju se u inkubatoru dok se ne postigne potpuni citopatogeni učinak kao posljedica transdukcije adenovirusnim vektorom (48 do 72 h nakon transdukcije). Pipetiranjem se stanice, zajedno s hranjivom podlogom, skupljaju u epruvetu i centrifugiraju (10 min; 1100 x g). Dobiveni talog stanica resuspendira se u hranjivoj podlozi DMEM-$FBS_{10\%}$ (10 mL) te se tri puta uzastopno zamrzava i odmrzava (-80°C; 37°C) kako bi se postigla liza stanica i oslobodili adenovirusni vektori. Nakon toga, provodi se centrifugiranje (10 min; 3600 x g) radi odvajanja grubih raspadnutih ostataka stanica (talog) od oslobođenih adenovirusnih vektora (supernatant). Adenovirusni vektori iz supernatanta pročišćavaju se u dva koraka: prvo na jastučiću cezijevog klorida (CsCl), a zatim u gradijentu CsCl. Pročišćavanje na jastučiću CsCl započinje dodatkom CsCl gustoće 1.4 g/mL (2.4 mL), na koji se nježno, uz stijenku, nadslojava CsCl gustoće 1.25 g/mL (2.4 mL), pri čemu se slojevi ne miješaju. Nakon toga, u epruvetu za centrifugiranje dodaje se supernatant lizata stanica s oslobođenim adenovirusnim vektorima, a zatim se do vrha epruvete dodaje hranjiva podloga DMEM-$FBS_{10\%}$. Uzorci se centrifugiraju u Beckman ultracentrifugi (rotor SW41Ti; 1 h i 45 min; 20°C; 60 000 x g), pri čemu se nakon centrifugiranja sloj adenovirusnih vektora uočava kao bijela opalescentna vrpca na granici između dva sloja CsCl. Dodatni sloj iznad sloja u kojem se nalaze adenovirusni vektori predstavlja zonu s nepotpunim adenovirusnim vektorima (npr. prazna kapsida). Sloj adenovirusnih vektora pažljivo se skuplja (u volumenu do 1.5 mL) pomoću šprice s iglom i prebacuje u novu epruvetu za centrifugiranje, u koju je prethodno dodan CsCl gustoće 1.34 g/mL. Uzorci se zatim centrifugiraju u Beckman centrifugi (rotor SW41Ti; preko noći; 20°C; 60 000 x g). Tijekom centrifugiranja, adenovirusni vektori zaustavljaju se u području gustoće koje odgovara njihovoj gustoći. Pomoću šprice s iglom adenovirusni vektori skupljaju se i prebacuju u novu epruvetu, nakon čega se CsCl uklanja tehnikom gel-filtracije pomoću kolone Sephadex G-25M. Kolona se pričvršćuje za stalak, a vrh se uklanja škarama. Kako bi tekućina mogla izlaziti, kolona se odčepljuje s gornje strane.

Ocjena rada u tijeku

Prije početka uklanjanja CsCl, kolona se ispire šest puta (s po 5 mL pufera PBS), nakon čega se dodaje pročišćeni adenovirusni vektor (ne više od 1 mL) i eluat (frakcija 0) se skuplja u mikroepruvetu. Dodatkom po 0.5 mL pufera PBS na kolonu, frakcije se skupljaju u označene mikroepruvete. Frakcijama koje sadrže adenovirusni vektor dodaje se glicerol (konačni volumni udio 10 %). Suspenzija adenovirusnih vektora dijeli se u alikvote i zamrzava na -80°C.

3.2.3. Obilježavanje HAdV-D26 fluorescentnom bojom

Nakon pročišćavanja, HAdV-D26 je obilježen fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488 5-TFP, koja se amidnom vezom veže na primarne amine proteina kapside adenovirusa. Boja se dodaje u 20 puta molarnom suvišku u odnosu na količinu adenovirusa i inkubira se (75 min; sobna temperatura) u mraku uz povremeno miješanje. Ostatak boje koji nije vezan na adenovirusne vektore uklanja se korištenjem Zeba Spin desalinizirajuće kolone, prema uputama proizvođača. Za ispiranje kolone koristi se pufer PBSΔ uz dodatak glicerola (konačnog volumnog udjela 10%). Suspenzija fluorescentno obilježenih adenovirusnih vektora razdjeljuje se u alikvote i zamrzava na -80°C.

3.2.4. Određivanje koncentracije HAdV-D26 u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Za određivanje koncentracije pročišćenih adenovirusnih vektora koristi se ranije opisana metoda [115]. Razrjeđenja pročišćenih adenovirusnih vektora pripremaju se u puferu PS i inkubiraju (10 min; 56°C) kako bi bila oslobođena virusna DNA iz kapside. Mikroepruvete s uzorcima kratko se centrifugiraju (30 s; 10 000 x g), nakon čega se mjeri apsorbancija supernatanta pri 260 nm. Očekivane vrijednosti apsorbancije nalaze se u rasponu od 0.02 do 0.15.

Koncentracija virusnih čestica računa se prema formuli:

$N \cdot A \cdot r \cdot 1{,}1 \cdot 10$ gdje je:

N – broj virusnih čestica u mL

A_{260} – izmjerena apsorbancija pri 260 nm

r – razrjeđenje suspenzije adenovirusa

Ocjena rada u tijeku

3.2.5. Određivanje uspješnosti transdukcije HAdV-D26 metodom spektrofotometrije

Stanice se nasađuju u pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića (4×10^3 stanica po bunariću), a nakon 48 h transduciraju se HAdV-D26 u konačnom volumenu od 50 µL. Broj dodanih adenovirusnih čestica po stanici (engl. *multiplicity of infection*, MOI) iznosi 10^4. Sat vremena nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj kultura stanica, hranjiva podloga s HAdV-om uklanja se i dodaje se svježa hranjiva podloga (100 µL). Nakon 24 h, hranjiva podloga se uklanja sa stanica, zatim se stanice ispiru PBSΔ-om (100 µL), a potom se na spektrometru mjeri razina fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina, kojeg HAdV-D26 nosi kao transgen. Ekscitacijska valna duljina za GFP iz HAdV-D26 iznosi 470 nm, a emisijska valna duljina 515 nm. Nakon toga, PBSΔ se uklanja sa stanica i dodaje se pripremljena boja Hoechst 33342 (5 µM), koja se veže za staničnu DNA. Boja se inkubira 15 minuta u mraku, pri sobnoj temperaturi, nakon čega se uklanja, a stanice se ispiru PBSΔ-om (100 µL). Nakon ponovnog dodavanja PBSΔ, mjeri se intenzitet fluorescencije stanica. Ekscitacijska valna duljina za boju Hoechst 33342 iznosi 355 nm, a emisijska valna duljina 455 nm. Rezultati se prikazuju kao ukupni izmjereni intenzitet fluorescencije u pojedinom bunariću i izražavaju se kao relativne vrijednosti.

3.2.6. Utišavanje gena transfekcijom malih interferirajućih RNA molekula

Kako bi se utišala ekspresija gena koji kodiraju proteine Rab, MyD88 ili TICAM-1, stanice se transficiraju specifičnim malim interferirajućim RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) uz pomoć komercijalno dostupnog reagensa DharmaFECT (Horizont Discovery, UK). Stanice se nasađuju u odgovarajuću posudu za uzgoj kultura stanica do popunjenosti površine oko 60 % i transficiraju (48 h) specifičnom siRNA ili kontrolnom siRNA pomoću reagensa DharmaFECT, prema uputama proizvođača. Korištene konačne koncentracije siRNA su:

- 10 nM za utišavanje Rab5 (si(Rab5)), Rab7 (si(Rab7)) i MyD88 (si(MyD88)) s pripadajućom kontrolom (si(-))
- ii) 25 nM za utišavanje Rab9 (si(Rab9)) s pripadajućom kontrolom (si(-))
- iii) 50 nM za TICAM-1 (si(TICAM-1)) s pripadajućom kontrolom (si(-))

Ocjena rada u tijeku

Ovako pripremljene stanice koriste se za određivanje uspješnosti transdukcije, ukupne količine proteina metodama SDS-PAGE i western blot, unutarstaničnog putovanja fluorescentno obilježenih adenovirusa te provjeru dinamike unosa virusne DNA u jezgru stanica.

3.2.7. Razdvajanje proteina elektroforezom u natrij dodecil sulfat poliakrilamidnom gelu i western blot

Za analizu količine proteina Rab5/7/9, MyD88 i TICAM-1 nakon utišavanja gena transfekcijom siRNA ili fosforiliranost proteina p38 i ERK, koriste se metode SDS-PAGE i western blot. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pomoću natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) omogućuje razdvajanje proteina samo na temelju razlike u molekulskoj masi. Stanični lizati se skupljaju (iz 3×10^5 stanica po uzorku) nakon dodavanja vrućeg (96°C) pufera za nanošenje uzoraka 1 × SB (sample buffer, 150 µL po uzorku) pom oću sterilne strugalice kojom se lizirane stanice odvajaju od podloge. U mikroepruvetama, skupljeni stanični lizati izlažu se ultrazvuku (3 × 5 sekundi s 30 % amplitude) i kratko centrifugiraju, a zatim se zagrijavaju pri 96°C (5 min) te nanose na gel.

Gelovi se pripremaju u plastičnim epruvetama od 50 mL i izlijevaju u kalup za izlijevanje gela. Prvo se polimerizira gel za razdvajanje, u kojem proteini putuju samo na temelju razlike u molekulskoj masi, a zatim se na njega nadslojava gel za sabijanje, koji omogućava koncentriranje uzorka. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje prikazan je u Tablici 12.

Tablica 12. Sastav gelova za razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE.

Komponenta	Gel za sabijanje (5 %)	Gel za razdvajanje (10 %)
diH_2O	2.1	4.0
akrilamid/bisakrilamid (30 %)	0.5	3.3
Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	0.38	-
Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M)	-	2.5
10% (w/v) SDS	0.03	0.1
10% (w/v) APS	0.03	0.1
TEMED	0.003	0.006
Ukupni volumen	**3**	**10**

Ocjena rada u tijeku

25 µL uzorka nanešenih na gel razdvaja se u Tris-glicinskom puferu za elektroforezu (pH 8.3) pri konstantnom naponu od 80 V. Kao standard za određivanje molekulskih masa nanosi se PageRuler Prestained Protein Ladder. Proteini se s gela prenose na nitroceluloznu membranu veličine pora 0.45 µm (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska) mokrim prijenosom u polju struje jakosti 400 mA tijekom 90 minuta. Za provjeru uspješnosti prijenosa proteina, membrana se uz miješanje boji otopinom boje amidocrno (1 min), nakon čega se odbojava uzastopnim izmjenama svježe otopine za odbojavanje do pojave jasnih vrpci proteina, te se tada snima fotografija membrane. Membrana se zatim ispire u puferu TBST, blokira u 5 % nemasnom mlijeku u TBST puferu pri sobnoj temperaturi (1 h) te se inkubira preko noći s primarnim protutijelom (4°C). Sljedeći dan, membrana se ispire jednom 15 min i dodatnih tri puta po 5 min u puferu TBST, nakon čega se inkubira s odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Nakon ispiranja membrane, vezanje sekundarnog protutijela vizualizira se pomoću kemiluminiscentnog reagensa Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Scientific, SAD) prema uputama proizvođača na uređaju ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, SAD). Kemiluminiscentni signal specifičnih vrpci proteina, te signal za bojanje ukupnih proteina (amidocrno), analizirani su pomoću programa ImageJ. Jačina signala za bojanje ukupnih proteina korištena je za normalizaciju rezultata.

3.2.8. Kolokalizacija fluorescentno obilježenog HAdV-D26 s markerom ranog ili kasnog endosoma metodom imunofluorescencije

Stanice se nasađuju na stakalca u pločici za uzgoj kultura stanica s 24 bunarića (2×10^4 stanica po bunariću).

- Za eksperiment u kojem se prati kolokalizacija fluorescentno obilježenog adenovirusa s markerom ranog (engl. Early Endosome Antigen 1; EEA1) ili kasnog endosoma (engl. Lysosomal Associated Membrane Protein 1; LAMP1) u stanicama A549 i A549-E6, stanice se dva dana nakon nasađivanja inkubiraju s HAdV26-AF488 (MOI 10^4) (300 µL po bunariću) na ledu, tijekom 45 minuta kako bi se uniformirao ulazak virusa. Zatim se stanice stavljaju u inkubator za uzgoj stanične kulture tijekom 10 minuta kako bi se potaknuo ulazak virusa nakon čega se hranjiva podloga zamijeni sa svježom hranjivom podlogom i stanice se ostave pri 37 ˚C određeni vremenski interval (0, 30, 60, 120, 240 min).

Ocjena rada u tijeku

- Za eksperiment u kojem se prati kolokalizacija fluorescentno obilježenog adenovirusa s EEA1 ili LMAP1 u stanicama A549 nakon inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze stanice se dva dana nakon nasađivanja predtretiraju 20 µM inhibitorom Pitstopom 2 tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi pri čemu je inhibitor pripremljen u mediju sa smanjenom količinom seruma ($DMEM_{0.2\%FBS}$). Zatim se stanice inkubiraju s HAdV26-AF488 (MOI 10^4) u mediju s Pitstopom 2, na ledu (300 µL po bunariću), tijekom 45 minuta kako bi se uniformirao ulazak virusa, a potom se stanice stavljaju u inkubator za uzgoj stanične kulture tijekom 10 minuta kako bi se potaknuo ulazak virusa nakon čega se hranjiva podloga zamijeni sa svježom hranjivom podlogom i stanice se ostave pri 37 ˚C određeni vremenski interval (0, 30, 60, 120 min).
- Za eksperiment u kojem se prati unutarstanično putovanje HAdV-D26 nakon utišavanja proteina Rab5, Rab7 ili Rab9 stanicama se specifične molekule siRNA dodaju isti dan kad se i nasađuju. Nakon 48 h, stanice se inkubiraju s HAdV26-AF488 (MOI 10^4) (300 µL po bunariću) na ledu, tijekom 45 minuta kako bi se uniformirao ulazak virusa. Zatim se stanice stavljaju u inkubator za uzgoj stanične kulture tijekom 10 minuta kako bi se potaknuo ulazak virusa nakon čega se hranjiva podloga zamijeni sa svježom hranjivom podlogom i stanice se ostave pri 37 ˚C određeni vremenski interval (30, 120 min).

U definiranim vremenima, stanice na stakalcima se fiksiraju dodavanjem 2 % otopine paraformaldehida (PFA) tijekom 12 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom se stakalca dva puta ispiru PBSΔ-om. Stanicama se dodaje se amonijev klorid (NH_4Cl, 25 mM u PBSΔ) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se smanjio fluorescentni signal molekula izvan stanica. Nakon toga, stakalca se dvaput ispiru PBSΔ-om. U eksperimentu u kojem je stanicama inhibirana klatrinom-posredovana endocitoza, kontrolne stanice, koje se fiksiraju odmah nakon 10-minutne inkubacije u inkubatoru, ne tretiraju se amonijevim kloridom kako bi se sačuvao fluorescentni signal HAdV-D26, budući da se virus u tom trenutku nalazi u otvorenim uvrnućima membrane. U ostalim vremenskim točkama (30, 60 i 120 minuta), zbog reverzibilnog djelovanja Pitstopa 2, virus nastavlja putovanje unutar stanice pa amonijev klorid djeluje samo na eventualno zaostale virusne čestice izvan stanica, na površini stakalca. Stanice na stakalcima se permeabiliziraju dodavanjem PBSΔ-0,1% Triton X-100 tijekom 2 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega se stakalca dva puta ispiru PBSΔ i inkubiraju s PBSΔ-3% BSA kroz 30 minuta pri sobnoj temperaturi kako bi

Ocjena rada u tijeku

se smanjilo nespecifično vezanje protutijela ili korištenih boja. Zatim se staklaca sa stanicama inkubiraju primarnim protutijelom za EEA1 ili LAMP1 60 minuta pri sobnoj temperaturi, tri puta se ispiru PBSΔ-om, a zatim inkubiraju sa sekundarnim protutijelom obilježenim Alexa Fluor 647 60 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku te se tri puta ispiru PBSΔ-om. Stanicama se, nakon inkubacije s protutijelima, dodaje fluorescentno obilježeni faloidin tijekom 20 minuta pri sobnoj temperaturi kako bi se vizualizirao aktin, nakon čega se stakalca sa stanicama dva puta ispiru PBSΔ, jednom s diH_2O, te se uklapaju u medij za uklapanje koji sadrži DAPI kako bi se fluorescentno obilježile jezgre stanica. Uzorci se snimaju pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 X koristeći HC PL APO CS2 63×/1.40 objektiv, a analizirani su pomoću programa Leica Application Suite X (LAS X) i ImageJ. U poglavlju 4.Rezultati prikazana su reprezentativna vidna polja maksimalnih projekcija konfokalnih snimaka svih snimanih slojeva.

3.2.9. Određivanje ekspresije gena citokina i kemokina potaknutih transdukcijom HAdV-D26 lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja

Stanice se nasade u pločice za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića (10^5 stanica po bunariću) te se nakon 48 sati stanice predtretiraju inhibitorom Pitstopom 2 (20 µM) koji je pripremljen u mediju sa smanjenom količinom seruma ($DMEM_{0.2\%FBS}$) ili hranjivom podlogom sa smanjenom količinom hranjivog seruma (DMEM-$FBS_{0,2\%}$), tijekom 30 minuta, pri sobnoj temperaturi. Nakon predtretmana, stanice se transduciraju s HAdV-D26 (MOI 10^4) u hranjivoj podlozi (DMEM-$FBS_{0,2\%}$) s inhibitorom Pitstop 2 ili bez inhibitora Pitstopom 2 (kontrolni uzorak) tijekom sat vremena, pri 37°C. Nakon 1 sata, stanice se ispiru PBSΔ-om (37°C, 500 µL) te se odvajaju od podloge korištenjem tripsina (37°C, 500 µL). Stanice se centrifugiranjem 5 minuta pri 1100 x g skupljaju kao talog koji se koristi za izolaciju ukupne RNA iz stanica i adneovirusa. Za izdvajanje ukupne RNA koristi se komplet High Pure RNA Isolation Kit prema uputama proizvođača. Koncentracija RNA određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm. Kao referentni uzorak pri mjerenju apsorbancije koristi se pufer za eluaciju iz korištenog kompleta. Kvaliteta RNA određuje se računanjem omjera između A_{260}/A_{280} koji iznosi između 1.8 i 2.1 te se dodatno provjerava elektroforezom na agaroznom gelu. Izolirana ukupna RNA koristi se za obrnuto prepisivanje (reverznu transkripciju, RT) pomoću

Ocjena rada u tijeku

kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit prema uputama proizvođača. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije korišteni za sintezu jednolančane komplementarne DNA (cDNA) iz ukupne RNA navedeni su u Tablici 13. cDNA dobivena obrnutim prepisivanjem izdvojene ukupne RNA koristi se za određivanje ekspresije citokina i kemokina koji su potaknuti transdukcijom HAdV-D26 u stanicama A549, A549 tretiranim inhibitorom Pitstopom 2, stanicama A549-E6 i A549-E6 tretiranim inhibitorom Pitstopom 2.

Tablica 13. Koncentracije komponenata za jedan uzorak RT i uvjeti reakcije.

Sastav reakcijske smjese				
komponenta			volumen (µL)	
10 x RT pufer			2.0	
25 x dNTP (100 mM)			0.8	
10 x RT nasumične početnice			2.0	
reverzna transkriptaza *Multi Scribe*			1.0	
diH2O bez nukleaza			4.2	
Ukupno po reakciji:			10.0	
Uvjeti reakcije				
	1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus
temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
trajanje	10 min	120 min	5 min	∞

Za određivanje ekspresije citokina i kemokina korištena je lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (Real Time q-PCR). Metoda se sastoji od ponavljajućih ciklusa u kojima se cDNA denaturira, nakon čega dolazi do vezanja specifičnih početnica za pojedini gen, te do produljivanja početnica i sinteze komplementarnog lanca pomoću DNA polimeraze. Nakon svakog ciklusa mjeri se količina DNA određivanjem signala fluorescentne boje SYBR Green koja se veže na DNA (interkalira između lanaca dvolančane DNA), te je fluorescentni signal direktno proporcionalan broju kopija umnožene DNA. Kao finalni rezultat očitava se broj ciklusa (engl. *threshold cycle*; CT) u kojem emisija fluorescencije prijeđe postavljeni prag iznad nespecifičnog signala. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 14. Za Real Time RT-PCR korišten je uređaj StepOnePlusTM Real-Time PCR System. Program StepOneSoftware (v 2.3) korišten je za dobivanje CT vrijednosti. Rezultati su normalizirani prema ekspresiji jednoliko

Ocjenski rad u tijeku

eksprimiranog gena GAPDH za dobivanje ΔΔCT, a relativna promjena je izračunata po standardnoj metodi $2^{-\Delta\Delta CT}$ [116].

Tablica 14. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije Real Time PCR

Sastav reakcijske smjese			
komponenta		volumen (µL)	
cDNA (1/500)		6	
SYBR Green (2x)		7.5	
početnica 1 (10 µM)		0.6	
početnica 2 (10 µM)		0.6	
diH2O bez nukleaza		0.3	
Ukupno po reakciji:		15.0	
Uvjeti reakcije			
	početna denaturacija	40 ciklusa	
		denaturacija	sparivanje početnica produljivanje lanca DNA
temperatura	95°C	95°C	60°C
trajanje	10 min	15 s	1 min

3.2.10. Određivanje količine izlučenih citokina i kemokina nakon transdukcije HAdV-D26 metodom ELISA

Stanice se nasade u pločice za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića (10^5 stanica po bunariću), te se nakon 48 h stanice predtretiraju inhibitorom Pitstopom 2 (20 µM) u mediju sa smanjenom količinom seruma (DMEM-$FBS_{0,2\%}$) ili hranjivom podlogom sa smanjenom količinom hranjivog seruma (DMEM-$FBS_{0.2\%}$) tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon predtretmana, stanice se transduciraju s HAdV-D26 (MOI 10^4) u hranjivoj podlozi (DMEM-$FBS_{0,2\%}$) s inhibitorom Pitstop 2 ili bez inhibitora Pitstopom 2 (kontrolni uzorak) tijekom sat vremena, pri 37°C. Nakon 1 sata, stanicama se dodaje svježa hranjiva podloga (1,5 mL) bez virusa. 24 sata nakon, supernatant iznad stanica se skuplja u mikroepruvetu, a količina izlučenih citokina i kemokina određuje se metodom ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay). ELISA se temelji na visokoj specifičnosti interakcija između protutijela i antigena, te je ovom metodom moguće dokazati prisutnost i odrediti koncentraciju različitih antigena. U ovom radu za ELISA metodu korišteni su IL-6 i IL-8 Human Uncoated ELISA Kit prema uputama proizvođača. Korištena je tzv. sandwich ELISA metoda u kojoj su ELISA pločice obložene veznim protutijelom, nakon čega je dodan

Odjena rada u tijeku

supernatant transdukcije pri čemu dolazi do vezanja antigena na vezno protutijelo. Nakon toga, dodano je detekcijsko protutijelo, specifično za drugi epitop istog antigena. Detekcijsko protutijelo ima vezan biotin, pa se dodavanjem avidin-HRP otopine avidin veže na biotin. HRP (engl. *horseradish peroxidase*) je enzim peroksidaza, izoliran iz hrena, koji prevodi naknadno dodani supstrat u kolorimetrijski produkt, koji je kvantificiran spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 570 nm i 450 nm.

3.2.11. Analiza dinamike dostave adenovirusne DNA u jezgru stanice metodom izolacije DNA iz nuklearne frakcije

Stanice se nasade u 10 cm petrijevu zdjelicu za uzgoj kultura stanica (2×10^6 stanica po zdjelici).

- Za eksperiment u kojem se prati dinamika dostave virusne DNA u stanicama A549 stanice se dan nakon nasađivanja inkubiraju s HAdV-D26 (MOI 10^4) (300 µL virusa pripremljenog u DMEM-$FBS_{0,2\%}$ dodaje se u 4 mL svježe hranjive podloge prethodno dodane u zdjelici) na ledu, tijekom 45 minuta, kako bi se uniformirao ulazak virusa. Zatim se stanice stavljaju u inkubator za uzgoj stanične kulture tijekom 5 minuta kako bi se potaknuo ulazak virusa nakon čega se hranjiva podloga zamijeni sa svježom hranjivom podlogom (bez virusa), a stanice se ostave pri 37 ˚C određeni vremenski interval (0, 60, 240 i 480 min).
- Za eksperiment u kojem se prati dinamika dostave virusne DNA u stanicama A549 nakon utišavanja proteina Rab9, isti dan kada se stanice nasade napravi se utišavanje Rab9 s transfekcijskim reagensom DharmaFECT. Nakon 48 h, stanice se inkubiraju s HAdV-D26 (MOI 10^4) (400 µL se dodaje u 3.6 mL svježe hranjive podloge u zdjelici) na ledu, tijekom 45 minuta kako bi se uniformirao ulazak virusa. Zatim se stanice stavljaju u inkubator za uzgoj stanične kulture tijekom 5 minuta kako bi se potaknuo ulazak virusa nakon čega se hranjiva podloga zamijeni sa svježom hranjivom podlogom (bez virusa), a stanice se ostave pri 37 ˚C određeni vremenski interval (60, 240 i 480 min).

U definiranom vremenu, stanicama se ukloni hranjiva podloga, isperu se PBSΔ-om i odvoje od podloge dodatkom tripsina (1 mL). Kako bi se inhibirao rad tripsina, stanicama se doda još 3 mL svježe hranjive podloge i ukupni volumen se podijeli u dvije mikroepruvete. Prvo se centrifugiranjem 5 minuta pri 1100 x g skuplja talog stanica, a potom se taj talog još

Ocjena rada u tijeku

jednom resuspendira u PBSΔ-u (500 µL) i centrifugiranjem ponovno spusti. Talog iz jedne mikroepruvete koristi se za izolaciju ukupne DNA, a talog iz druge mikroepruvete koristi se za izolaciju nuklearne frakcije. U talog za izolaciju nuklearnih frakcija dodaje se hipotonična otopina (MLIM1) (100 µL) tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se dodaje 0,05 % detergent NP-40 (100 µL) tijekom 10 minuta. Sve zajedno se vorteksira i centrifugira dvije minute pri 13,400 x g. Talog stanica se zatim 4 puta ispire sa po 500 µL PBSΔ, a dobiveni, blago prozirni talog predstavlja nuklearne frakcije. Za izdvajanje ukupne stanične i virusne DNA koristi se komplet QIAamp DNA Blood Mini Kit prema uputama proizvođača. Koncentracija DNA određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm. Kao referentni uzorak pri mjerenju apsorbancije koristi se pufer za eluaciju iz kompleta QIAamp DNA Blood Mini Kit**.** Kvaliteta DNA određuje se računanjem omjera između A260/A280 koji iznosi između 1.8 i 2.1. DNA dobivena izolacijom iz taloga čitavih stanica (ukupna frakcija) ili iz taloga nuklearnih frakcija koristi se za praćenje dinamike dostave virusne DNA. Izolirana DNA korištena je kao kalup za qPCR korištenjem početnica za gen CMV, specifičan za virusnu DNA, a količina unesene virusne DNA u jezgru stanica izražena je kao omjer nuklearne i ukupne frakcije.

Ocjena rada u tijeku

4. Rezultati

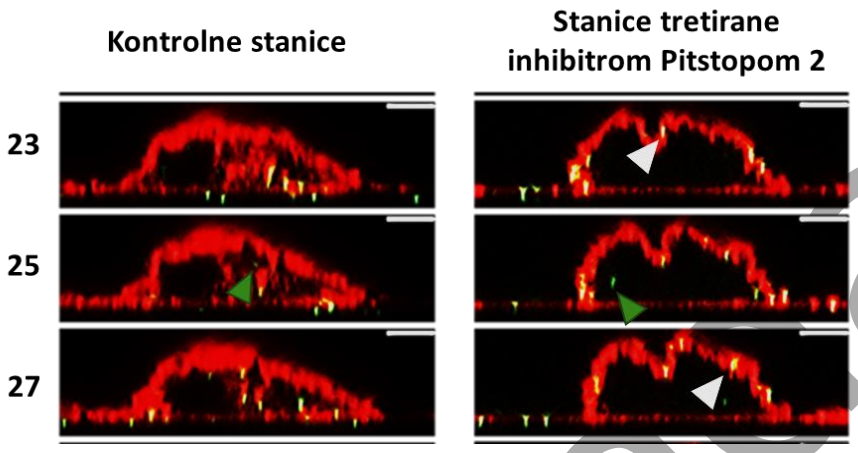
Ocjena rada u tijeku

4.1. Utjecaj inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i povećane ekspresije integrina αvβ3 na unutarstanično putovanje HAdV-D26

4.1.1. Inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze i povećana količina integrina αvβ3 uzrokuju sporije oslobađanje HAdV-D26 iz ranog endosoma i njegovo smanjeno zaostajanje u kasnom endosomu

Prethodna istraživanja provedena u našoj grupi pokazala su razliku u unutarstaničnom putovanju između HAdV-C5 i HAdV-D26. Praćenjem unutarstaničnog putovanja fluorescentno obilježenih HAdV-C5 i HAdV-D26 uočeno je da se nakon jednog sata HAdV-C5 smješta u blizini jezgre stanice, dok se HAdV-D26 i nakon četiri sata transdukcije nalazi u širem perinuklearnom području (neobjavljeni rezultati). Korištenjem modela stanica A549 i pripadajućeg klona A549-E6 s povećanom ekspresijom integrina αvβ3 potrebnog za uspješnu transdukciju stanica epitela čovjeka HAdV-D26 [81], pokazano je da ulazak HAdV-D26 u obje stanične linije djelomično ovisi o proteinu dinaminu-2. Dok u stanicama A549-E6 ulazak HAdV-D26 dodatno ovisi i o proteinu kaveolinu-1, u stanicama A549 endocitoza HAdV-D26 ovisi o proteinu klatrinu, ali samo na razini receptora jer smanjenje razine ekspresije proteina klatrina povećava ekspresiju integrina αvβ3 što rezultira uspješnijom transdukcijom HAdV-D26. Zanimljivo je da je i povećana količina HAdV-D26 kao i uspješnija transdukcija HAdV-D26 u stanicama A549 zabilježena i nakon tretmana inhibitorom klatrinom-posredovane endocitoze, molekulom Pitstop 2. Međutim, tretman stanica Pitstopom 2 nije uzrokovao promjenu u ekspresiji integrina αvβ3, stoga povećanje transdukcije HAdV-D26 nakon inhibicije klatrinom-posredovane endicitoze nije povezano s ekspresijom integrina αvβ3 [82]. Dodatno, konfokalnom mikroskopijom pokazano je da tretman Pitstopom 2 zaustavlja HAdV-D26 u neposrednoj blizini membrane stanice u odnosu na netretirane stanice (slika 6). Trenutno se ne zna kako povećana ekspresija integrina αvβ3, odnosno inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze, utječu na unutarstanično putovanje HAdV-D26.

Ocjena rada u tijeku



Slika 6. Inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze zaustavlja HAdV-D26 u blizini membrane stanice. Stanice A549 su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C) nakon čega im je dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2. Zadnjih 5 min inkubacije s virusom na stanice je dodan WGA (eng. *Wheat Germ Agglutinin*) koji se vezao na glikoproteine membrane stanice te su stanice nakon ispiranja fiksirane (2 % PFA) i snimane konfokalnom mikroskopijom. Prikazane su odabrane XZ osi konfokalnog prikaza. Zeleno - virus, crveno – membrana, žuto -kolokalizacija virusa i membrane. Zelene strelice predstavljaju virus, a bijele strelice predstavljaju kolokalizaciju virusa i membrane stanice *(Rezultati prikazani uz dopuštenje dr.sc. Davora Nestića)*

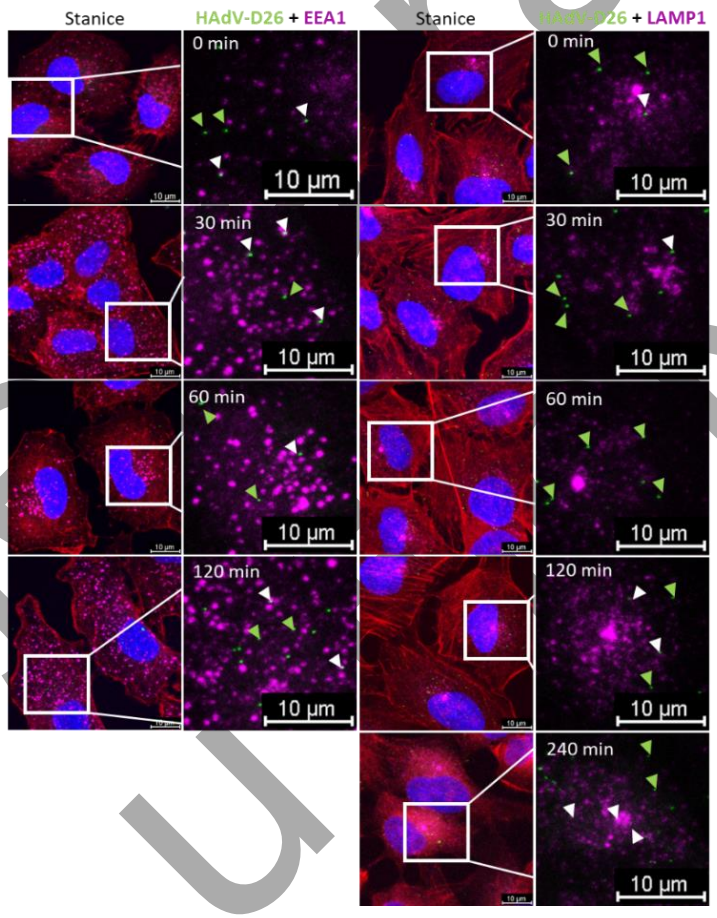
U prvom dijelu ove doktorske disertacije istražena je unutarstanična lokalizacija HAdV-D26 u vremenu do četiri sata nakon početka transdukcije i to u tri uvjeta: (1) u stanicama A549, (2) u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 kojima je nakon sinkroniziranog ulaska HAdV-D26 u stanice medij zamijenjen svježim medijem bez inihibitora, i (3) u stanicama A549-E6. Kako bi se utvrdilo u kojim se endocitoznim odjeljcima HAdV-D26 nalazi nakon ulaska u stanicu, konfokalnom mikroskopijom je vizualizirana kolokalizacija fluorescentno obilježenog HAdV-D26 sa proteinskim markerom ranog endosoma (EEA1) ili proteinskim markerom kasnog endosoma/lizosoma (LAMP1) (slike 7A, 8A i 9A).

Rezultati unutarstaničnog putovanja u sva tri navedena uvjeta ukazuju da HAdV-D26 boravi unutar ranog i kasnog endosoma/lizosoma s razlikama u vremenu zadržavanja u ranom endosomu i ukupnoj količini virusa lokaliziranoj u ranom i kasnom endosomu/lizosomu. U stanicama A549, približno 30 minuta nakon transdukcije, većina HAdV-D26 lokalizirana je u ranom endosomu (slika 7B) nakon čega se količina HAdV-D26 u ranom endosomu postupno smanjuje, dok se istovremeno povećava količina HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu. Količina HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu ostaje gotovo nepromijenjena u rasponu od 45-50 %, sve do četiri sata nakon transdukcije. U stanicama

Ocjena rada u tijeku

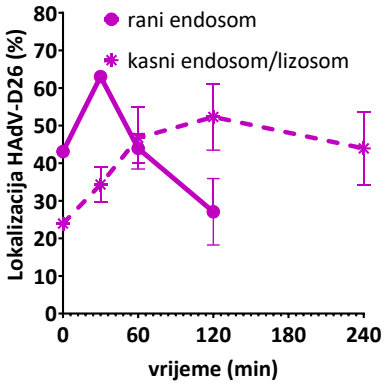
A549, 30 minuta nakon transdukcije, ukupna količina HAdV-D26 uočenog unutar ranog i kasnog endosoma/lizosoma iznosi 96 %, ali se taj postotak tijekom vremena smanjuje (slika 7B). Nakon jednog sata 89 % virusa nalazi se unutar nekog od endosoma, dok se nakon dva sata taj udio smanjuje na 77 %. Ovo smanjenje ukazuje na bijeg HAdV-D26 iz ranog endosoma u citoplazmu stanice tijekom rane faze transdukcije s obzirom da se količina HAdV-D26 u kasnim endosomima/lizosomima u periodu između 30 i 120 min nakon transdukcije povećava (sa 34% na 51%), a nakon čega ostaje gotovo nepromijenjena - što upućuje na zaostajanje ovog virusa u kasnim endosomima/lizosomima (slika 7B).

A



Ocjena rada

B



	30 min	60 min	120 min
% HAdV-D26 unutar endocitoznog odjeljka	96	89	77
% HAdV-D26 unutar EEA1 pozitivnog endosoma	62	43	26
% HAdV-D26 unutar LAMP1 pozitivnog endosoma	34	46	51

Slika 7. Lokalizacija HAdV-D26 unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosma u stanicama A549 tijekom vremena. (A) Kolokalizacija HAdV-D26 s markerom ranog (EEA1) ili kasnog endosoma/lizosoma (LAMP1) u stanicama A549 praćena je konfokalnom mikroskopijom. Stanicama je dodan HAdV-D26 na ledu (MOI 10^4; 45 min) nakon čega su stanice premještene 10 min na 37 ˚C da bi se omogućio ulazak virusa u stanice. Stanice su potom isprane kako bi se uklonili virusi koji nisu ušli u stanicu. Nakon dodatka svježeg medija, stanice su u definiranim vremenskim intervalima (0, 30, 60, 120 i 240 min) fiksirane (2 % PFA), permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelom za EEA1 ili LAMP1 (2h, sobna temperatura), a zatim i s flourescentno obilježenim sekundarnim protutijelom. Zeleno – HAdV-D26 ; plavo – jezgra (DAPI), crveno – aktinski citoskelet ; magenta – marker ranog ili marker kasnog endosoma/lizosoma (EEA1/LAMP1). Slike stanica prikazuju maksimalnu projekciju konfokalnih snimaka slojeva stanica. Virus i marker ranog ili kasnog endosoma/lizosoma prikazani su u uvećanom području definiranom bijelim okvirom u reprezentativnim stanicama. Zelene strelice predstavljaju virus koji ne kolokalizira s markerom, a bijele strelice predstavljaju kolokalizaciju virusa i markera. (B) Kvantifikacija lokaliziranog HAdV-D26 unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosoma tijekom vremena prikazana kao postotak HAdV-D26 koji kolokalizira s markerom ranog ili markerom kasnog endosoma/lizosoma. Linija na grafu prikazuje srednju vrijednost uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

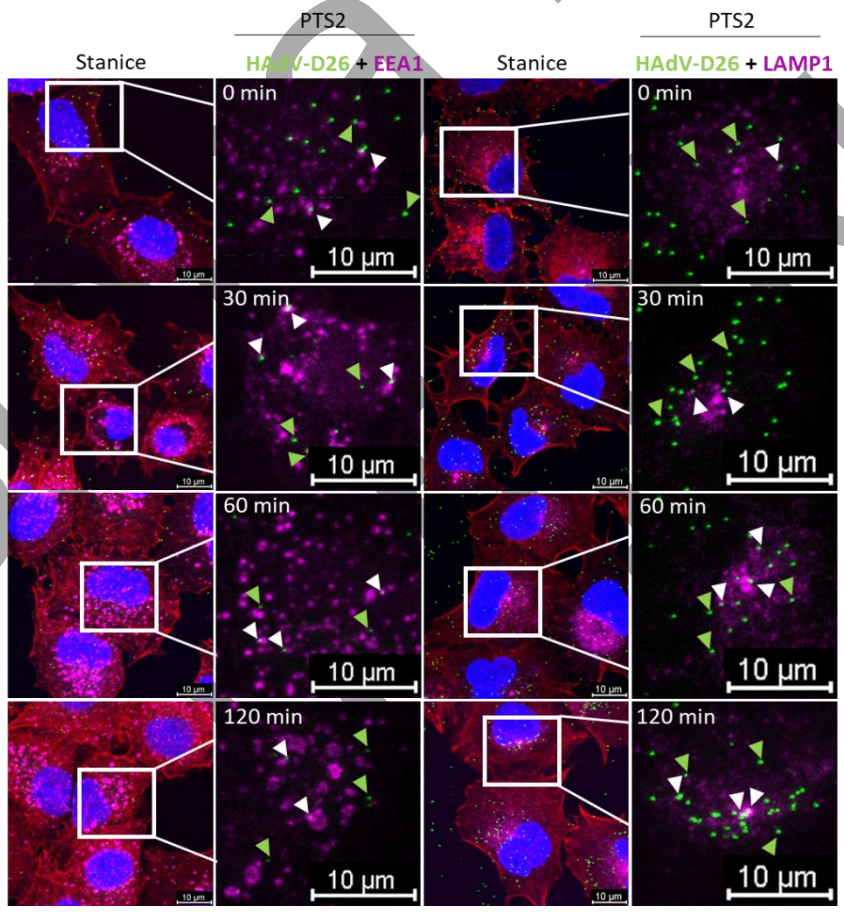
Rezultati kolokalizacije HAdV-D26 s markerom ranog ili kasnog endosoma/lizosoma u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 pokazuju da je u slučaju inhibirane klatrinom-posredovane endocitoze potrebno dulje vrijeme da virus postigne maksimalnu lokalizaciju unutar ranog endosoma (dodatnih 30 minuta), a najveća količina virusa identificirana u ranom endosomu manja je u usporedbi s netretiranim stanicama A549 (55 % u odnosu na 62 %) (slika 8C). Međutim, tijekom preostalog vremena transdukcije, količina HAdV-D26 u ranom endosomu u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 veća je nego u netretiranim stanicama A549 u istim vremenskim točkama (60 i 120 min). Putovanje HAdV-D26 kroz kasni endosom/lizosom, u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 usporedivo je s putovanjem u netretiranim stanicama A549, osim što je u kasnim endosomima/lizosomima

Ocjena rada u tijeku

tijekom čitavog vremena transdukcije prisutna nešto niža količina HAdV-D26 (slika 8D). Ukupna lokalizacija virusa unutar ranog i kasnog endosoma/lizosoma 30 minuta nakon transdukcije iznosi 66 %, a taj postotak raste tijekom vremena na 91 %, gdje približno ostaje nepromijenjen i dva sata nakon transdukcije (slika 8B).

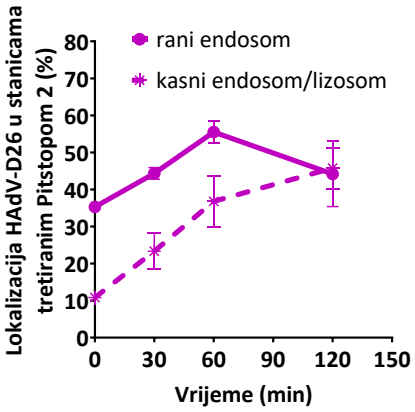
Zaključno, krivulje lokalizacije HAdV-D26 u ranim ili kasnim endosomima/lizosomima u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 slične su onima u stanicama A549, ali sa vremenskim pomakom što je u skladu s činjenicom da je djelovanje Pitstopa 2 reverzibilno. Naime, kad se Pitstop 2 ukloni sa stanica, HAdV-D26 nastavlja putovanje kroz citoplazmu nakon što je bio zaustavljen ispod membrane. Dodatno, moguće je uočiti da je u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 manje virusa lokalizirano u kasnim endosomima/lizosomima, što može biti razlog bolje uspješnosti transdukcije HAdV-D26 [82].

A



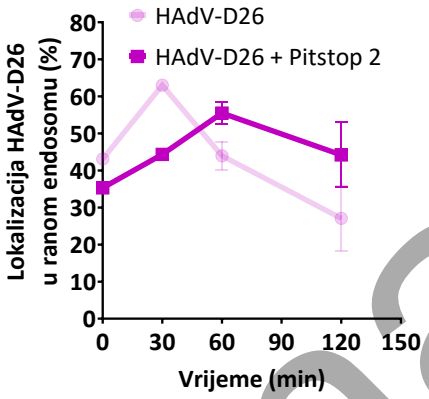
Ocjena rada

B

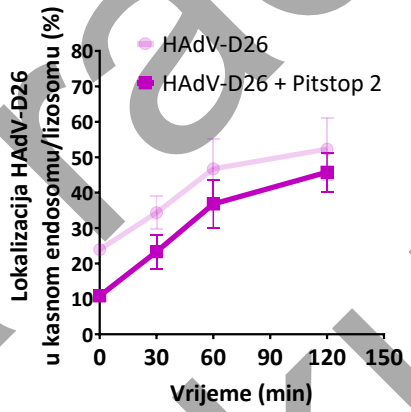


	30 min	60 min	120 min
% HAdV-D26 unutar endocitoznog odjeljka	66	91	88
% HAdV-D26 unutar EEA1 pozitivnog endosoma	44	55	43
% HAdV-D26 unutar LAMP1 pozitivnog endosoma	22	36	45

C



D



Slika 8. Lokalizacija HAdV-D26 unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosma u stanicama A549 tretiranim inhibitorom Pitstopom 2 tijekom vremena. (A) Kolokalizacija HAdV-D26 s markerom ranog (EEA1) ili kasnog endosoma/lizosoma (LAMP1) u stanicama A549 tretiranim inhibitorom Pitstopom 2 praćena je konfokalnom mikroskopijom. Stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je dodan HAdV-D26 na ledu (MOI 10^4; 45 min) nakon čega su stanice premještene 10 min na 37 ˚C da bi se omogućio ulazak virusa u stanice. Stanice su potom isprane kako bi se uklonili virusi koji nisu ušli u stanicu. Nakon dodatka svježeg medija, stanice su u definiranim vremenskim intervalima (0, 30, 60, 120 i 240 min) fiksirane (2 % PFA), permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelom za EEA1 ili LAMP1 (2h, sobna temperatura), a zatim i s flourescentno obilježenim sekundarnim protutijelom. Zeleno – HAdV-D26 ; plavo – jezgra (DAPI), crveno – aktinski citoskelet ; magenta – marker ranog ili marker kasnog endosoma/lizosoma (EEA1/LAMP1). Slike stanica prikazuju maksimalnu projekciju konfokalnih snimaka slojeva stanica. Virus i marker ranog ili kasnog endosoma/lizosoma prikazani su u uvećanom području definiranom bijelim okvirom u reprezentativnim stanicama. Zelene strelice predstavljaju virus koji ne kolokalizira s markerom, a bijele strelice predstavljaju kolokalizaciju virusa i markera. (B) Kvantifikacija lokaliziranog HAdV-D26 unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosoma tijekom vremena prikazana kao postotak HAdV-D26 koji kolokalizira s markerom ranog ili markerom kasnog endosoma/lizosoma. Linija na grafu prikazuje srednju vrijednost uz standardna odstupanja. (C) Usporedba kvantifikacije lokaliziranog HAdV-D26 u ranom endosomu, u stanicama A549 i stanicama A549 tretiranim inhibitorom Pitstopom 2 te (D) usporedba kvantifikacije lokaliziranog HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu, u stanicama A549 i stanicama A549 tretiranim inhibitorom Pitstopom 2 prikazana kao postotak HAdV-D26 koji kolokalizira s markerom ranog ili markerom kasnog endosoma/lizosoma tijekom vremena. Linije na

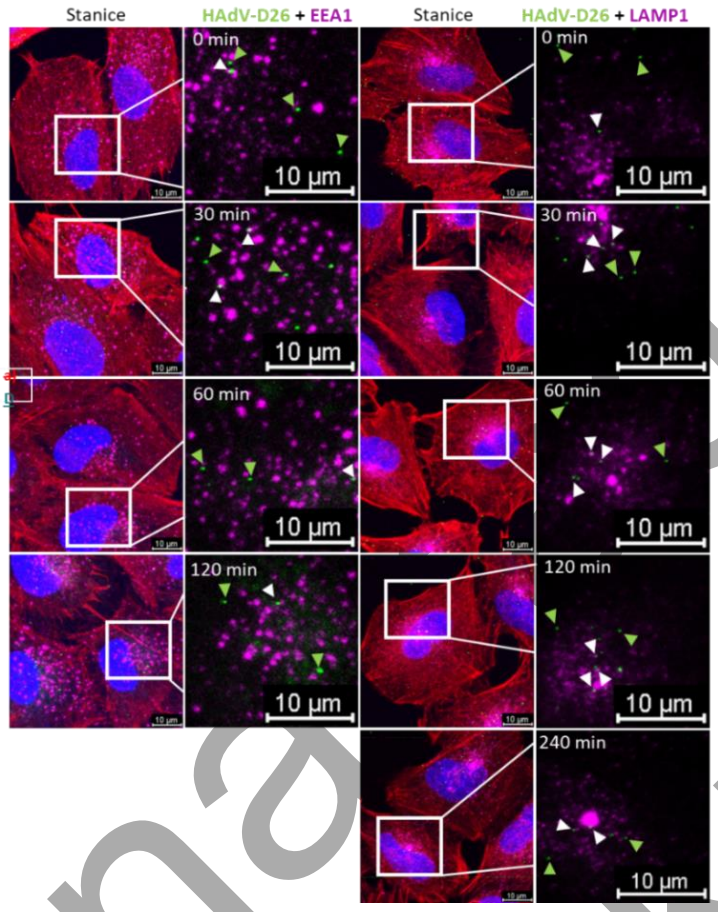
Ocjena rada u tijeku

grafovima prikazuju srednju vrijednost uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

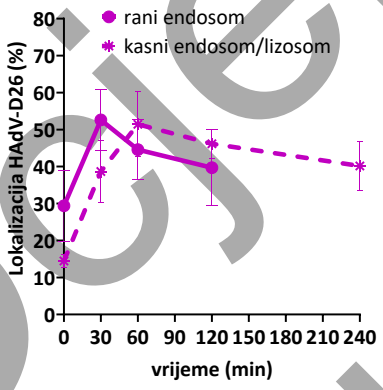
Unutarstanično putovanje HAdV-D26 u stanicama A549-E6 pokazuje sličnu vremensku dinamiku postizanja najveće lokalizacije u ranom endosomu kao u stanicama A549 (Slika 8C). 30 minuta nakon transdukcije, 52 % virusa lokalizira u ranom endosomu u stanicama A549-E6 što je manje nego 62 % u stanicama A549 (Slika 6B i 8B). Međutim, 120 minuta nakon transdukcije, veća količina HAdV-D26 zaostaje u ranom endosomu u stanicama A549-E6 u odnosu na stanice A549 (Slika 8C). Lokalizacija HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu u stanicama A549-E6, usporediva je s onom u stanicama A549, uz razliku što HAdV-D26 u stanicama A549-E6 brže doseže maksimalnu lokalizaciju u kasnom endosomu/lizosomu (60 minuta ranije) (Slika 9D). Također, veći udio virusa napušta kasni endosom/lizosom u razdoblju između jednog i četiri sata nakon transdukcije u stanicama A549-E6 (s 51 % na 39 %) u odnosu na stanice A549 (s 46 % na 43 %) (Slika 9D). Ukupna količina virusa lokalizirana unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosoma, 30 minuta nakon transdukcije, iznosi 90 % dok se tijekom vremena taj postotak smanjuje na 84 % (slika 9B). Zaključno, HAdV-D26 u stanicama A549-E6 zaostaje dulje vrijeme u ranom endosomu, a u kasnijoj fazi transdukcije više virusa izlazi iz kasnog endosoma/lizosoma, što može biti jedan od razloga povećane transdukcije u ovim stanicama [81]. Različito unutarstanično putovanje HAdV-D26 uočeno između stanica A549 i stanica A549-E6 posljedica je različite količine integrina αVβ3 te uključenosti drugačijih proteina tijekom ulaska HAdV-D26 u stanicu [10].

Ocjena rada u tijeku

A

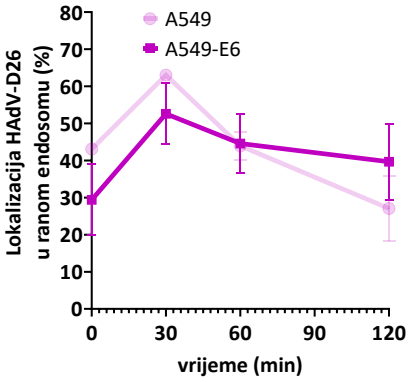


B

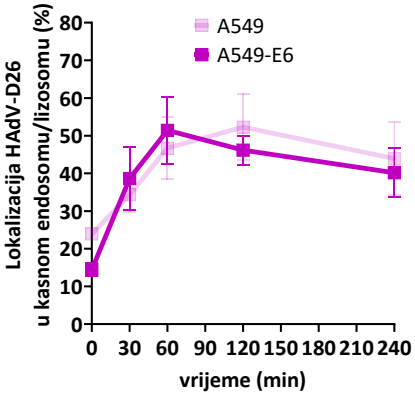


	30 min	60 min	120 min
% HAdV-D26 unutar endocitoznog odjeljka	90	95	84
% HAdV-D26 unutar EEA1 pozitivnog endosoma	52	44	39
% HAdV-D26 unutar LAMP1 pozitivnog endosoma	38	51	45

C



D



Ocjenski primjerak

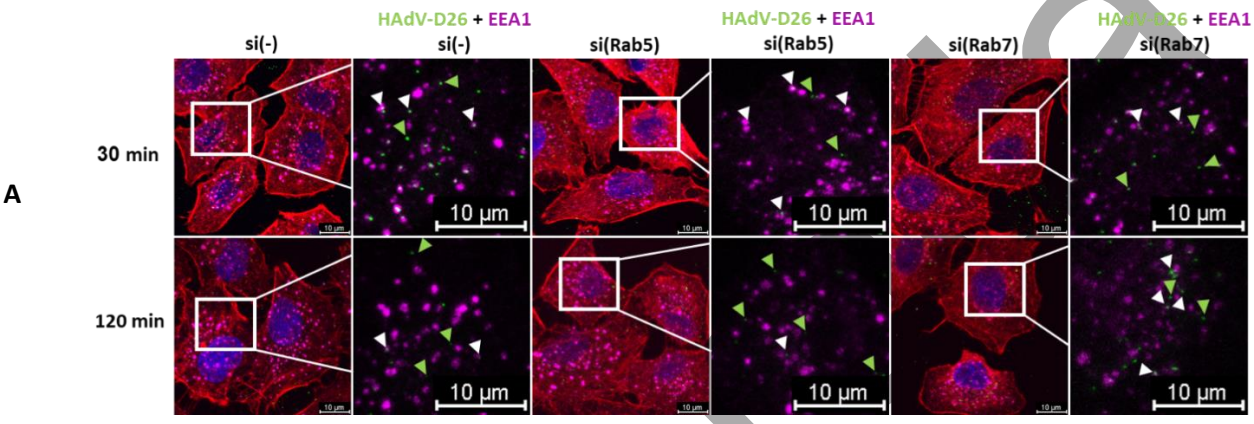
Slika 9. Lokalizacija HAdV-D26 unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosma u stanicama A549-E6 tijekom vremena. (A) Kolokalizacija HAdV-D26 s markerom ranog (EEA1) ili kasnog endosoma/lizosoma (LAMP1) u stanicama A549-E6 praćena je konfokalnom mikroskopijom. Stanicama je dodan HAdV-D26 na ledu (MOI 10^4; 45 min) nakon an HAdV-D26 na ledu (MOI 10g (EEA1) ili kasnog endosoma/lizosoma (LAMP1) u stanicama A5Stanice su potom isprane kako bi se uklonili virusi koji nisu uendosoma/lizosomakon dodatka svježeg medija, stanice su u definiranim vremenskim intervalima (0, 30, 60, 120 i 240 min) fiksirane (2 % PFA), permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelom za EEA1 ili LAMP1 (2h, sobna temperatura), a zatim i s flourescentno obiljeaenim sekundarnim protutijelom. Zeleno – HAdV-D26 ; plavo – jezgra (DAPI), crveno – aktinski citoskelet ; magenta – marker ranog ili marker kasnog endosoma/lizosoma (EEA1/LAMP1). Slike stanica prikazuju maksimalnu projekciju konfokalnih snimaka slojeva stanica. Virus i marker ranog ili kasnog endosoma/lizosoma prikazani su u uvećanom području definiranom bijelim okvirom u reprezentativnim stanicama. Zelene strelice predstavljaju virus koji ne kolokalizira s markerom, a bijele strelice predstavljaju kolokalizaciju virusa i markera. (B) Kvantifikacija lokaliziranog HAdV-D26 unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosoma tijekom vremena prikazana kao postotak HAdV-D26 koji kolokalizira s markerom ranog ili markerom kasnog endosoma/lizosoma. Linija na grafu prikazuje srednju vrijednost uz standardna odstupanja. (C) Usporedba kvantifikacije lokaliziranog HAdV-D26 u ranom endosomu, u stanicama A549 i stanicama A549-E6 te (D) usporedba kvantifikacije lokaliziranog HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu, u stanicama A549 i stanicama A549-E6 prikazana kao postotak HAdV-D26 koji kolokalizira s markerom ranog ili markerom kasnog endosoma/lizosoma tijekom vremena. Linije na grafovima prikazuju srednju vrijednost uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

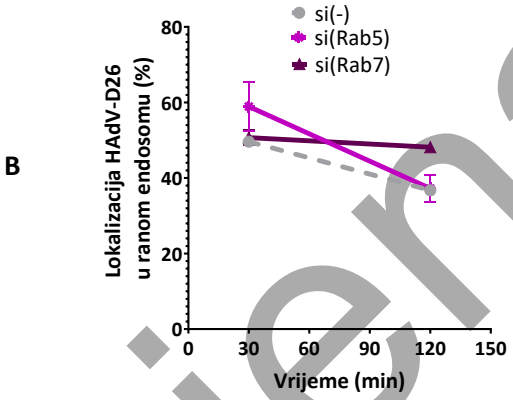
4.1.2. Proteini Rab5 i Rab7 sudjeluju u regulaciji unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 u ranom endosomu dok protein Rab9 regulira unutarstanično putovanje HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu

Ulaskom virusa u stanicu endocitozom formira se endosom čije kretanje unutar stanice reguliraju proteini Rab [111]. Rab5 povezan je s regulacijom kretanja i sazrijevanjem ranog endosma dok se Rab7 i Rab9 povezuju sa sazrijevanjem kasnog endosoma/lizosoma [117, 118]. Kako bi se detaljnije istražila uloga proteina Rab5, Rab7 i Rab9 u unutarstaničnom putovanju HAdV-D26, analizirana je kolokalizacija HAdVD-26 s proteinom EEA1 u stanicama A549, nakon utišavanja proteina Rab5 i Rab7 (Slika 10A). Rezultati pokazuju da utišavanje proteina Rab5 u stanicama A549 povećava lokalizaciju HAdV-D26 u ranom endosomu 30 minuta nakon transdukcije (58 %), u odnosu na kontrolne stanice (49 %), ali se s vremenom njegova količina vraća na razinu kontrolnih stanica (35 %) (Slika 10B). Utišavanje proteina Rab7 u stanicama A549 ne mijenja količinu HAdV-D26 lokaliziranog u ranom endosomu 30 minuta nakon transdukcije, ali tijekom preostalih 90 minuta uzrokuje

Ocjena rada u tijeku

povećanu lokalizaciju HAdV-D26 u ranom endosomu (48 %) u usporedbi sa kontrolnim stanicama A549 (37 %) (slika 10B) što ukazuje da Rab7 ima ulogu u oslobađanju HAdV-D26 iz ranog endosoma.





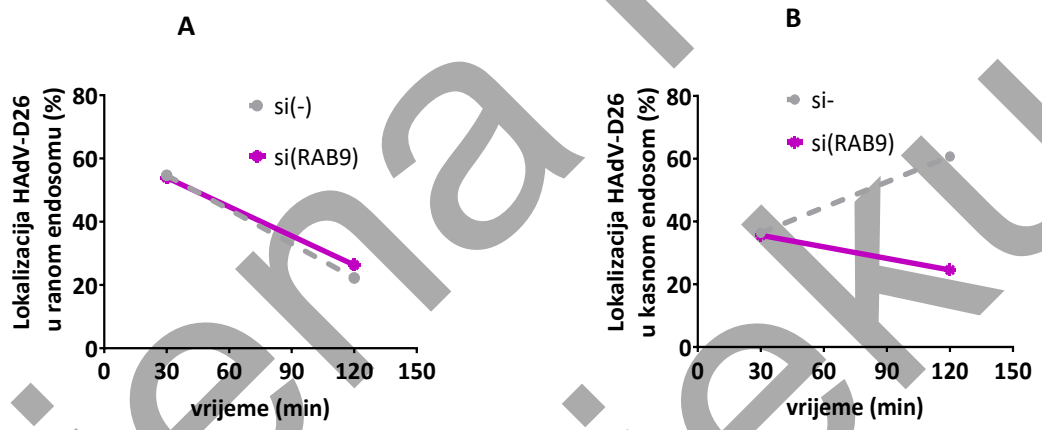
Slika 10. Lokalizacija HAdV-D26 u ranom endosomu u stanicama A549, s utišanim proteinima Rab5 i Rab9 tijekom vremena. (A) Kolokalizacija HAdV-D26 s markerom ranog endosoma (EEA1) u stanicama A549 nakon utišavanja proteina Rab5 i Rab7 praćena je konfokalnom mikroskopijom. Stanicama su utišani proteini Rab5 ili Rab7 (48 h; 37 ˚C), a zatim je dodan HAdV-D26 na ledu (MOI 10^4; 45 min) nakon čega su stanice premještene 10 min na 37 ˚C da bi se omogućio ulazak virusa u stanice. Stanice su potom isprane kako bi se uklonili virusi koji nisu ušli u stanicu. Nakon dodatka svježeg medija, stanice su u definiranim vremenskim intervalima (30 i 120 min) fiksirane (2 % PFA), permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelom za EEA1 (2h, sobna temperatura), a zatim i s flourescentno obilježenim sekundarnim protutijelom. Zeleno – HAdV-D26 ; plavo – jezgra (DAPI), crveno – aktinski citoskelet ; magenta – marker ranog endosoma (EEA1). Slike stanica prikazuju maksimalnu projekciju konfokalnih snimaka slojeva stanica. Virus i marker ranog ili kasnog endosoma/lizosoma prikazani su u uvećanom području definiranom bijelim okvirom u reprezentativnim stanicama. Zelene strelice predstavljaju virus koji ne kolokalizira s markerom, a bijele strelice predstavljaju kolokalizaciju virusa i markera. (B) Kvantifikacija lokaliziranog HAdV-D26 u stanicama A549 unutar ranog endosoma tijekom vremena, nakon utišavanja proteina Rab5 I Rab7 prikazana kao postotak HAdV-D26 koji kolokalizira s markerom ranog endosoma. Linija na grafu prikazuje srednju vrijednost uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Također, istražena je i uloga proteina Rab9 u unutarstaničnom putovanju HAdV-D26. Rezultati kolokalizacije HAdV-D26 s proteinom EEA1, nakon utišavanja proteina Rab9, pokazuju da nema promjene u lokalizaciji virusa unutar ranih endosoma tijekom vremena

Ocjena u tijeku

(slika 11A). Suprotno tome, utišavanje proteina Rab9 dovodi do smanjene kolokalizacija HAdV-D26 i proteina LAMP1 (24 %) u odnosu na stanice A549 kojima nije utišan protein Rab9 (60 %), što ukazuje na smanjenu lokalizaciju HAdV-D26 unutar kasnih endosoma/lizosoma u prvih 120 minuta transdukcije (slika 11B).

Zaključno, utišavanje proteina Rab5 povezanog s formiranjem i maturacijom ranog endosoma te Rab7, povezanog sa sazrijevanjem ranog endosoma u kasni endosom, uzrokuje povećanu lokalizaciju HAdV-D26 u ranim endosomima, ali u različitim vremenima od početka transdukcije. Protein Rab9 nije uključen u regulaciju unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 u ranim endosomima, ali ima ulogu u regulaciji unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 u kasnim endosomima/lizosomima.



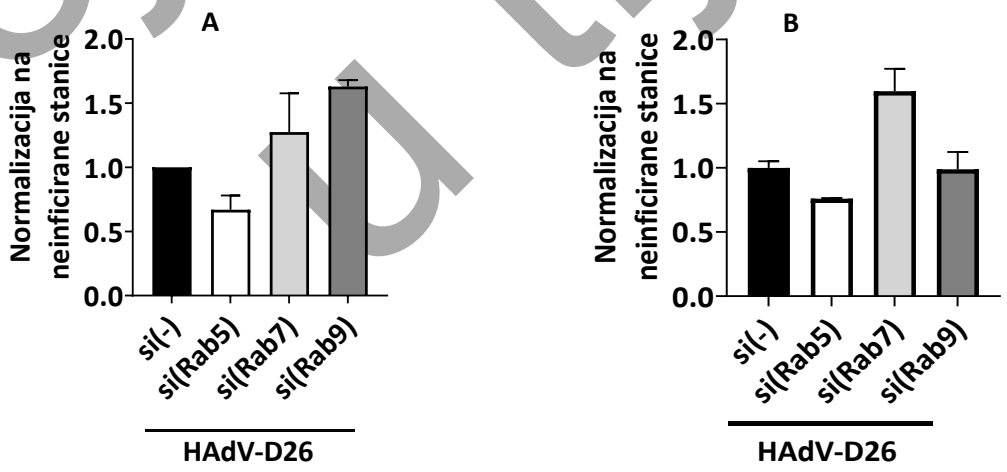
Slika 11. Lokalizacija HAdV-D26 u ranom (A) ili kasnom endosomu/lizosomu (B), u stanicama A459, nakon utišavanja proteina Rab9. (A) Kvantifikacija HAdV-D26 s markerom ranog endosoma (EEA1) ili (B) kasnog endosoma/lizosoma (LAMP1) u stanicama A549, nakon nakon utišavanja proteina Rab9 prikazana kao postotak HAdV-D26 koji kolokalizira s EEA1 ili LAMP1 tijekom vremena. Dobiveni podaci rezultat su analize snimaka konfokalnog mikroskopa. Stanicama je utišan protein Rab9 (48 h; 37 ˚C), a zatim je dodan HAdV-D26 na ledu (MOI 10^4; 45 min) nakon čega su stanice premještene 10 min na 37 ˚C da bi se omogućio ulazak virusa u stanice. Stanice su potom isprane kako bi se uklonili virusi koji nisu ušli u stanicu. Nakon dodatka svježeg medija, stanice su u definiranim vremenskim intervalima (30 i 120 min) fiksirane (2 % PFA), permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelom za EEA1 ili LAMP1 (2h, sobna temperatura), a zatim i s flourescentno obilježenim sekundarnim protutijelom. Linije na grafovima prikazuju srednju vrijednost uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Ocjena rada u tijeku

4.1.3. Smanjena količina proteina Rab7 pospješuje transdukciju HAdV-D26 u stanicama A549-E6 dok smanjena količina proteina Rab9 pospješuje transdukciju HAdV-D26 u stanicama A549

Promjene kolokalizacije HAdV-D26 s markerom ranog endosoma ili markerom kasnog endosoma/lizosoma u uvjetima smanjene razine ekspresije Rab proteina ukazuju na njihovu važnu ulogu u unutarstaničnom putovanju HAdV-D26. Kako bi se detaljnije ispitao utjecaj proteina Rab na uspješnost transdukcije, stanice A549 i A549-E6, s utišanim proteinima Rab5, Rab7 i Rab9, transducirane su HAdV-D26. Analiza rezultata u stanicama A549 pokazuje da utišavanje proteina Rab9 pospješuje transdukciju 60 %. Suprotno tome, utišavanje proteina Rab5 smanjuje uspješnost transdukcije za 34 % (slika 10A) dok utišavanje Rab7 ne mijenja uspješnost transdukcije. U stanicama A549-E6, utišavanje proteina Rab7 pospješuje transdukciju za 59 %. Zanimljivo, u stanicama A549-E6 utišavanje proteina Rab 5 ili Rab9 nema utjecaj na uspješnost transdukcije HAdV-D26 (slika 12B).

Zaključno, u stanicama A549 utišavanje proteina Rab9, uključenog u regulaciju putovanja kasnih endosoma/lizosoma, pospješuje transdukciju HAdV-D26, dok u stanicama A549-E6 utišavanje proteina Rab7 pospješuje transdukciju. S obzirom na to da se stanice A549 i A549-E6 razlikuju po količini integrina αvβ3, odnosno, načinu na koji HAdV-D26 ulazi u ove stanice [82], ovi rezultati ukazuju da bi povezanost proteina Rab i uspješnosti transdukcije HAdV-D26 mogla ovisiti o receptoru, odnosno endocitoznom putu koji HAdV-D26 koristiti za transdukciju.



Slika 12. Uspješnost transdukcije HAdV-D26 u epitelnim stanicama, nakon utišavanja proteina Rab. (A) Uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 ili (B) stanicama A549-E6, nakon

Ocjena rada u tijeku

utišavanja proteina Rab5/7/9 transfekcijom malih interferirajućih molekula RNA izmjerena je spektrofotometrijski. Stanicama su utišani proteini Rab5, Rab7 ili Rab9 (48 h; 37 ˚C), a zatim je dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h; 37;), a zatim je promijenjen medij te su stanice ostavljene u kulturi (24 h; 3724 . Drugi dan, spektrofotometrijski je izmjeren intenzitet flourescencije zelenog fluorescentnog proteina (515 nm) koji HAdV-D26 nosi kao transgen. Nakon mjerenja intenziteta fluorescencije proteina, staniama je fluorescentnom bojom (Hoechst 33342) obojana DNA i izmjeren je intenzitet flourescencije (455 nm). Rezultati su prikazani kao omjer GFP/Hoechst vrijednosti i normalizirani na stanice utišane nespecifičnom siRNA molekulom (si-) inficirane HAdV-D26. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

4.1.4. Protein Rab9 utječe na dostavu DNA HAdV-D26 u jezgru stanice

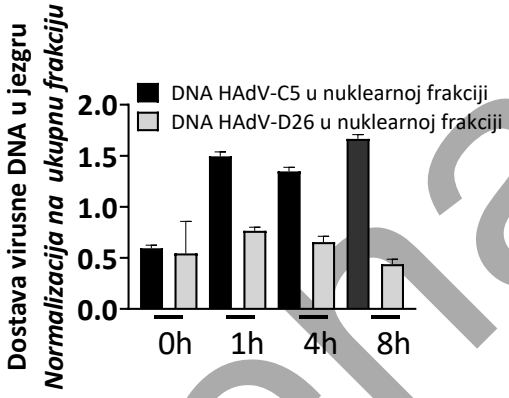
S obzirom na to da je smanjena količina proteina Rab9 dovela do smanjene lokalizacije HAdV-D26 u kasnim endosomima/lizosomima (Slika 11B) te istovremeno povećala uspješnost transdukcije HAdV-D26 (Slika 12A), u nastavku istraživanja proučavana je dostava DNA HAdV-D26 u jezgru stanica A549 s ili bez utišanog proteina Rab9. Iz stanica A549, u vremenskim intervalima od 0 h, 1 h, 4 h i 8 h je iz ukupne stanične frakcije izdvojena nuklearna frakcija te je praćena promjena količine DNA HAdV-D26 dostavljena u jezgru stanice (slika 13). Kao referentni podaci korišteni su rezultati dostave DNA HAdV-C5, budući da je iz literature poznato da se njegova DNA nalazi u jezgri stanice već unutar jednog sata od početka transdukcije (Slika 13) [119]. Dobiveni rezultati ukazuju da je u stanicama A549 najveća količina virusne DNA u jezgri (vrijednost 0.76) nakupljena sat vremena nakon transdukcije HAdV-D26. Nakon četiri sata transdukcije, količina detektirane virusne DNA nije promijenjena (vrijednost 0.65), dok se nakon osam sati količina smanjuje (vrijednost 0.43) (Slika 13). Za razliku od HAdV-D26, većina DNA HAdV-C5 nakupljena je u jezgri stanice već unutar sat vremena od početka transdukcije nakon čega se količina HAdV-C5 DNA u jezgri značajno ne mijenja (Slika 13). Zaključno, najveća količina DNA HAdV-D26 u jezgri stanica A549 zabilježena je jedan sat nakon transdukcije. HAdV-D26 u usporedbi s HAdV-C5 unosi manju količinu DNA u jezgru.

Rezultati u stanicama A549 sa smanjenom količinom proteina Rab9 pokazuju da je količina virusne DNA detektirane u jezgri najveća sat vremena nakon transdukcije (0.74), a nakon sedam sati transdukcije uočeno je smanjenje količine nakupljene virusne DNA (0.41) (Slika 14). Ako se promatra količina DNA u nuklearnoj frakciji nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 kojima je dodana nespecifična siRNA, i usporedi s količinom DNA u nuklearnoj frakciji nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 s utišanim Rab9,

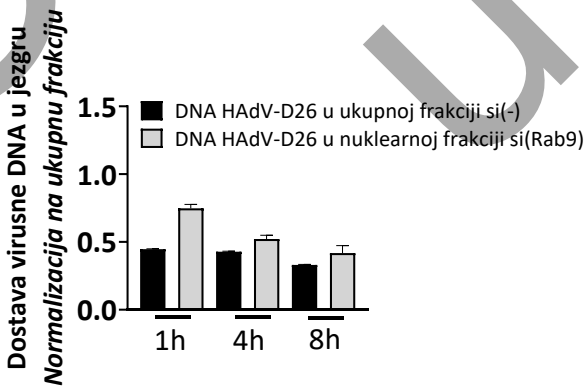
Ocjena rada u tijeku

uočava se razlika. Naime, sat vremena nakon transdukcije, u stanicama A549 s utišanim Rab9, količina detektirane DNA je veća (0.74) u odnosu na količinu detektiranu u stanicama A549 s nepromijenjenom količinom Rab9 (0.44) (slika 14). Tijekom preostalog vremena transdukcije, količina nakupljenje DNA u jezgri stanica usporediva je bez obzira na količinu proteina Rab9 (slika 14).

Zaključno, promjena unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 u kasnim endosomima/lizosomima uslijed utišavanja proteina Rab9, mijenja i dostavu virusne DNA. Točnije, povećan izlazak HAdV-D26 iz lizosoma zbog smanjene količine proteina Rab9 povećava količinu dostavljene DNA HAdV-D26 u jezgru stanica A549.



Slika 13. Kinetika dostave DNA HAdV-C5 ili DNA HAdV-D26 u jezgru stanica A549. DNA virusa kvantificirana u ukupnoj i nuklearnoj frakciji tijekom vremena prikazana je kao vrijednost koja u obzir uzima normalizaciju na konstitutivno eksprimiran gen GAPDH i koja je normalizirana na vrijednost ukupne frakcije. Stanicama je dodan HAdV-D26 na ledu (MOI 10^4; 45 min). Nakon transdukcije (5 min; 37 ˚C) stanice su isprane kako bi se uklonili virusi koji nisu ušli u stanicu. Nakon dodatka svježeg medija, u definiranim vremenskim intervalima (0, 1, 4 i 8 h) stanice su skupljene. Dodatkom hipotonične otopine, detergenta i centrifugiranjem, nuklearna frakcija je izdvojena od ostatka staničnog materijala. Iz uzoraka je izolirana DNA koje je dalje korištena kao kalup u qPCR-u. Rezultati za pojedini virus prikazuju omjer vrijednosti nuklearne frakcije (normalizirane prema konstitutivno eksprimiranom genu GAPDH) u odnosu na vrijednost ukupne frakcije (normalizirane prema konstitutivno eksprimiranom genu GAPDH). Prikazan je rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.



Slika 14. Kinetika dostave DNA HAdV-D26 u jezgru stanica A549 sa smanjenom količinom Rab9 (si(Rab9)). DNA HAdV-D26 kvantificirana u ukupnoj i nuklearnoj frakciji nakon utišavanja proteina Rab9 prikazana je kao vrijednost koja u obzir uzima normalizaciju na konstitutivno eksprimiran gen GAPDH I koja je normalizirana na vrijednost ukupne frakcije Stanicama je dodana nespecifična siRNA, si(-) ili utišan protein Rab9 (48 h; 37 ˚C), a zatim je dodan HAdV-D26 na ledu (MOI 10^4; 45 min). Nakon transdukcije (5 min; 37 ˚C) stanice su isprane kako bi se uklonili virusi koji nisu ušli u stanicu. Nakon dodatka svježeg medija, u definiranim vremenskim intervalima

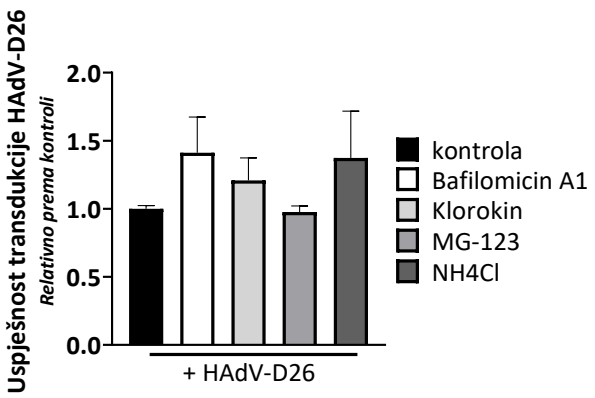
Ocjena rada u tijeku

(1, 4 i 8 h) stanice su skupljene. Dodatkom hipotonične otopine, detergenta i centrifugiranjem, nuklearna frakcija je izdvojena od ostatka staničnog materijala. Iz uzoraka je izolirana DNA koje je korištena kao kalup u qPCR-u. Rezultati za pojedini virus prikazuju omjer vrijednosti nuklearne frakcije (normalizirane prema konstitutivno eksprimiranom genu GAPDH) u odnosu na vrijednost ukupne frakcije (normalizirane prema konstitutivno eksprimiranom genu GAPDH). Prikazan je rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

4.1.5. Zaustavljanje zakiseljavanja kasnih endosoma/lizosoma povećava uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549

Tijekom sazrijevanja, endosomi prolaze kroz promijene pH vrijednosti, pri čemu su kasni endosomi/lizosomi kiseliji u usporedbi s ranim endosomima. Iz literature je poznato da unos tvari u stanicu endocitozom može rezultirati dvjema sudbinama: recikliranjem ili razgradnjom tvari u lizosomima pri čemu je razgradnja povezana sa sazrijevanjem kasnog endosoma u lizosom, što uključuje i zakiseljavanje [120]. Važnost zakiseljavanja endosoma tijekom bijega adenovirusa nije u potpunosti razjašnjena [33, 35]. Rezultati lokalizacije HAdV-D26 tijekom vremena pokazali su da u stanicama A549 virus zaostaje u kasnim endosomima/lizosomima. Kako bi se istražila povezanost zakiseljavanja endosoma i uspješnosti transdukcije HAdV-D26, stanice su prije i tijekom transdukcije tretirane različitim inhibitorima koji utječu na zakiseljavanje lizosoma. Nakon tretmana stanica A549 inhibitorom bafilomicinom A1, koji zaustavlja lizosomalno zakiseljevanje tako što inhibira prijenos protona u lizosom, došlo je do povećanja uspješnosti transdukcije HAdV-D26 za 40 % (slika 12). Osim toga, bolja uspješnost transdukcije uočena je i nakon tretmana stanica A549 NH_4Cl-om (37 %), spojem koji također onemogućuje zakiseljavanje lizosoma (slika 15). Suprotno tome, nepromijenjena transdukcija uočena je u stanicama A549 nakon tretmana klorokinom, spojem koji sprječava zakiseljavanje lizosoma te nakon tretmana inhibitorom proteasoma, molekulom MG-123 koja inhibira protealitičku aktivnost podjedinice kompleksa proteasoma (slika 15). Zaključno, uspješnost transdukcije HAdV-D26 ovisi o kiselosti kasnog endosoma/lizosoma pri čemu je viši pH povezan s uspješnijom transdukcijom.

Ocjena rada u tijeku

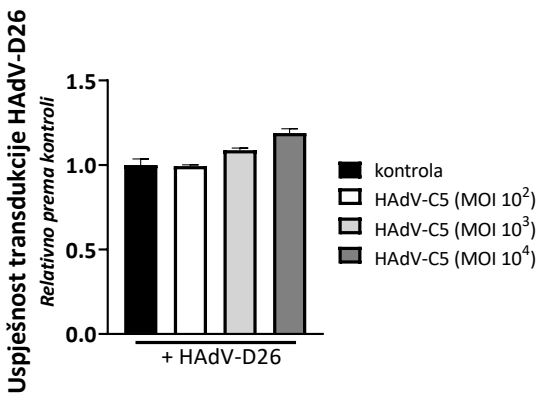


Slika 15. Uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 nakon tretmana različitim inhibitorima koji utječu na zakiseljavanje lizosoma. Stanice su predtretirane inhibitorima (30 min; 37 ˚C) - bafilomicin A1 (10 nM), klorokin (50 µM), inhibitor proteasoma MG132 (50 µM) i NH4Cl (5 mM), a zatim je dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h; 37˚C). Nakon promijenjenog medija, stanice su ostavljene u inkubatoru (24 h; 37˚C) te je sljedeći dan spektrofotometrijski izmjeren intenzitet flourescencije zelenog fluorescentnog proteina (515 nm) koji HAdV-D26 nosi kao transgen. Nakon mjerenja intenziteta, obojana je stanična DNA (Hoechst 33342) i izmjeren je intenzitet flourescencije (455 nm). Rezultati su prikazani kao omjer GFP/Hoechst vrijednosti i normalizirani na stanice A549 inficirane HAdV-D26 koje nisu bile tretirane inhibitorom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

4.1.6. Uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 nije poboljšana kotransdukcijom s HAdV-C5

Bijeg HAdV-D26 iz ranog i/ili kasnog endosoma/lizosoma, u stanicama A549 tijekom vremena, pokazao se uspješnim za tek 19 % virusa (slika 7B). Kako bi se razjasnilo može li HAdV-D26 koristiti isti mehanizam ulaska u stanicu ili mehanizam izlaska iz istog endosoma kao i HAdV-C5, te tako uspješnije pobjeći iz endosoma i dostaviti svoj genetički materijal u jezgru stanica, napravljena je kotransdukcija HAdV-D26 i HAdV-C5. Stanicama A549 dodana je jednaka količina HAdV-D26 i tri različite količine HAdV-C5, nakon čega je praćena uspješnost transdukcije. Rezultati su pokazali da je uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 pri dodatku sve tri količine HAdV-C5 nepromijenjena (slika 16). Zaključno, HAdV-C5 i HAdV-D26 ne dijele isti mehanizam ulaska u stanicu ili mehanizam izlaska iz endosoma.

Ocjena rada u tijeku



Slika 16. Uspješnost transdukcije HAdV-D26, u stanicama A549 nakon kotransdukcije s HAdV-C5 izmjerena je spektrofotometrijski. Stanice su transducirane HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h; 37˚C) i trima različitim količinama HAdV-C5 (MOI 10^2, 10^3, 10^4; 1h; 37˚C). Nakon promijenjenog medija, stanice su ostavljene u kulturi (24 h; 37˚C). Drugi dan, spektrofotometrijski je izmjeren intenzitet flourescencije zelenog fluorescentnog proteina (515 nm) koji HAdV-D26 nosi kao transgen. HAdV-C5 kao transgen nosi gen za β-galaktozidazu zbog čega ne ometa mjerenje usoješnosti transdukcije HAdV-D26. Nakon mjerenja intenziteta zelenog fluorescentnog proteina, obojana je stanična DNA (Hoechst 33342) i izmjeren je intenzitet flourescencije (455 nm). Rezultati su prikazani kao omjer GFP/Hoechst vrijednosti i normalizirani na stanice A549 inficirane HAdV-D26. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

4.2. Aktivacija urođene imunosti nakon transdukcije HAdV-D26 u uvjetima različitog unutarstaničnog putovanja

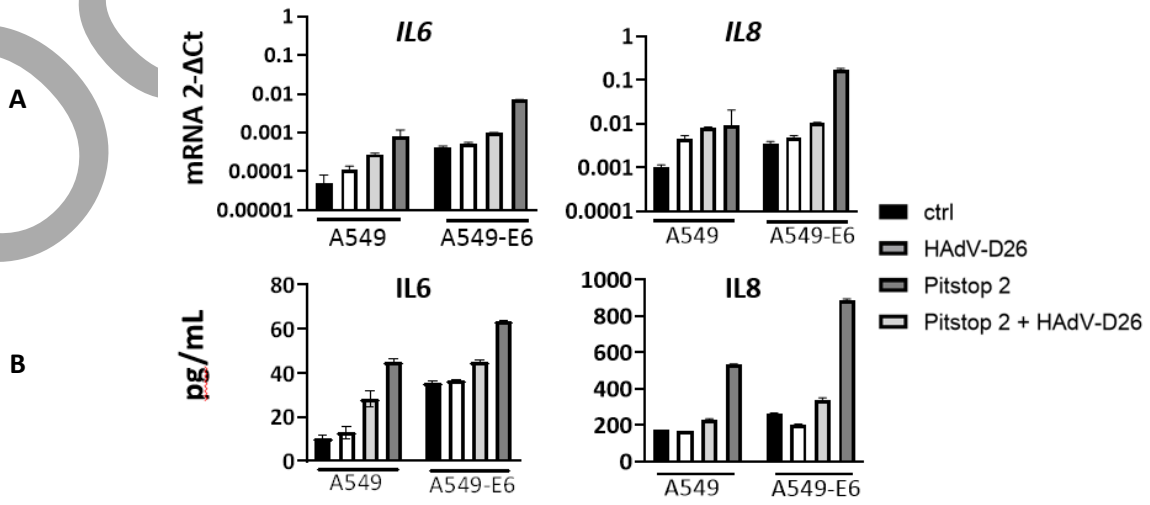
4.2.1. Zaustavljanje HAdV-D26 u blizini membrane stanice povećava razinu ekspresije i lučenja IL6 i IL8 u stanicama A549 i A549-E6

Literaturni podaci povezuju infekciju adenovirusom s upalnim citokinima i kemokinima, poput IL6 i IL8 [64, 121]. Naše prethodno istraživanje pokazalo je da transdukcije HAdV-D26 potiče ekspresiju gena *IL6* i *IL8 in vitro* u ovisnosti o αvβ3 integrinu [81]. U drugom dijelu ove doktorske disertacije istražena je aktivacija urođenog imunosnog odgovora tijekom prvih sat vremena transdukcije HAdV-D26 i to u četiri uvjeta: (1) u stanicama A549, (2) u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 kontinuirano tijekom transdukcije, (3) u stanicama A549-E6 i (4) u stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 kontinuirano tijekom transdukcije. S ciljem boljeg razumijevanja povezanosti različitog unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 s potencijalno drugačijom aktivacijom urođene imunosti, u navedenim modelima qPCR-om su određene razine ekspresije gena *IL6* i *IL8* jedan sat nakon transdukcije HAdV-D26. Dodatno, metodom ELISA izmjerene su količine izlučenih proteina IL6 i IL8 u mediju 24 sata nakon transdukcije HAdV-D26.

Ocjena rada u tijeku

Rezultati pokazuju da se nakon transdukcije HAdV-D26, razina ekspresije oba gena povećala u odnosu na kontrolne stanice A549 (2.3 puta za *IL6* i 4.5 puta za *IL8*) (slika 17A). Tretman stanica A549 Pitstopom 2 i transdukcija HAdV-D26 povećali su razinu ekspresije *IL6* u odnosu na stanice A549 tretirane Pitstopom 2 (2.9 puta), dok je razina ekspresija *IL8* ostala nepromijenjena (slika 17A). Količina izlučenih proteina IL6 i IL8, u stanicama A549 nakon transdukcije HAdV-D26, slična je kontrolnim stanicama A549 dok je u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 količina izlučenog IL6 porasla 1,5 puta, a količina IL8 1,4 puta u odnosu na stanice A549 koje su samo tretirane Pitstopom 2 (slika 17B).

Transdukcija HAdV-D26 u stanicama A549-E6 nije promijenila razinu ekspresiju *IL6*, dok je razina ekspresije *IL8* povećana 1.4 puta u odnosu na kontrolne stanice A549-E6 (slika 14A). Tretman stanica A549-E6 Pitstopom 2 i transdukcija HAdV-D26 povećali su razinu ekspresije *IL6* (7.1 puta) i *IL8* (17 puta) u odnosu na stanice A549-E6 tretirane Pitstopom 2 (slika 17A), a uočeno je i povećano lučenje proteina IL6 (1.4 puta) i IL8 (2.6 puta) (slika 17B). Ako se usporede stanice A549 i A549-E6, stanice A549-E6 pokazuju povećanu razinu ekspresije i lučenja IL6 u svim uvjetima u odnosu na stanice A549 (slika 17A). Osim toga, stanice A549-E6 imaju povećanu razinu ekspresije i lučenja IL8 u uvjetu tretmana Pitstopom 2 i transdukcijom HAdV-D26 (slika 17A). Zaključno, stanice A549 i A549-E6 tretirane Pitstopom 2, kod kojih je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane stanice, pokazuju povećanu razinu ekspresije i lučenja IL6 i IL8.



Slika 17. Razina ekspresije gena *IL6* i *IL8* i lučenje proteina IL6 i IL8 u stanicama A549 i A549-E6 nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. (A) Razina ekspresije gena *IL6* i *IL8* u A549 i A549-E6 stanicama, 1 h nakon transdukcije određena je metodom qPCR. Stanice su

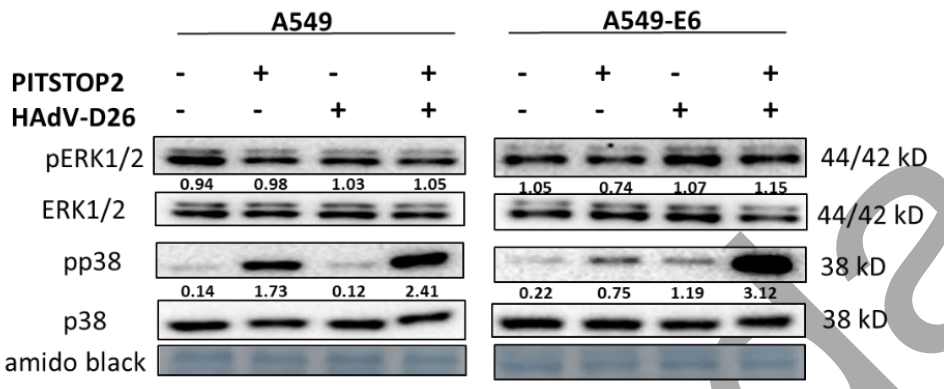
Original rad

predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2. Iz skupljenih stanica izolirana je RNA te je metodom qPCR kvantificirana razina ekspresije gena *IL6* i *IL8*. Rezultati su normalizirani prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen *GAPDH*) i prikazani kao apsolutne vrijednosti uz standardna odstupanja. (B) Količina izlučenih proteina IL6 i IL8 u supernatantu stanica A549 i A549-E6, 24 sata nakon transdukcije izmjerena ELISA metodom. Stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s/bez inhibitora Pistopa 2. Nakon uklanjanja medija iz svih uvjeta, dodan je svježi medij, a stanice su inkubirane 24 h. Nakon inkubacije skupljen je supernatant. Količina izlučenih citokina izračunata je ekstrapolacijom iz krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

3.2.2. Razina ekspresije gena *IL6* u stanicama A549 i A549-E6, uslijed zaustavljanja HAdV-D26 u blizini membrane stanice, kao i nakon infekcije HAdV-D26 u stanicama A549-E6, djelomično ovisi o aktivnosti kinaze p38

Staničnom prepoznavanju virusa posreduju PRR-ovi pri čemu njihova aktivacija pokreće nizvodne signalne puteve uključene u imunosni odgovor stanice. Tri signalna puta imaju središnju ulogu u aktivaciji urođenog imunosnog odgovora nakon infekcije: (1) signalni put posredovan MAPK, (2) signalni put posredovan transkripcijskim faktorom NF-Kb i (3) signalni put posredovan transkripcijskim faktorom IRF [122-124]. Prema literaturi transdukcija stanica adenovirusnim vektorima može potaknuti aktivaciju kinaza MAPK puta poput proteina ERK i p38 [62, 125]. Kako bi se istražilo potiče li transdukcija HAdV-D26 aktivaciju MAPK signalnog puta, analizirana je količina fosforiliranih oblika proteina ERK i p38 nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. Rezultati pokazuju da je u stanicama A549 nakon transdukcije HAdV-D26, količina fosforiliranog oblika proteina ERK usporediva s količinom u kontrolnim, neinficiranim stanicama A549 (slika 18). Slično je uočeno i u stanicama A549 tretiranim Pistopom 2 i inficiranim HAdV-D26 gdje je količina fosforiliranog oblika proteina ERK usporediva s količinom u stanicama A549 koje su samo tretirane Pitstopom 2. S druge strane, uključenost proteina p38 u aktivaciju signalnih puteva urođene imunosti pokazuje razlike u odnosu na protein ERK. Iako je količina fosforiliranog oblika proteina p38 u stanicama A549 inficiranim HAdV-D26 usporediva s količinom u neinficiranim stanicama A549, u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 i inficiranim HAdV-D26 uočeno je povećanje količine fosforiliranog oblika proteina p38 za 1.4 puta u odnosu na količinu u stanicama A549 tretiranih Pitstopom 2 (Slika 18).

Ocjena rada u tijeku



Slika 18. Aktivacija proteina ERK i p38 u stanicama A549 i A549-E6 nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26 analizirana je razdvajanjem proteina SDS-PAGE-om i Western blotom korištenjem specifičnih protutijela. Stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C), a zatim je dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2. Stanice su zatim skupljene u vrućem SB puferu. Rezultati dobiveni denzitometrijskom analizom kemiluminiscentnih signala MAP kinaza u stanicama A549 i A549-E6, nakon transdukcije i/ili tretmana inhibitorom Pitstopom 2 iskazane kao brojčane vrijednosti na slici prikazuju omjer fosforiliranog proteina prema ukupnoj količini nefosforiliranog proteina. Membrana obojana amido black bojom pokazuje ujednačenu količinu nanesenog uzoraka. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

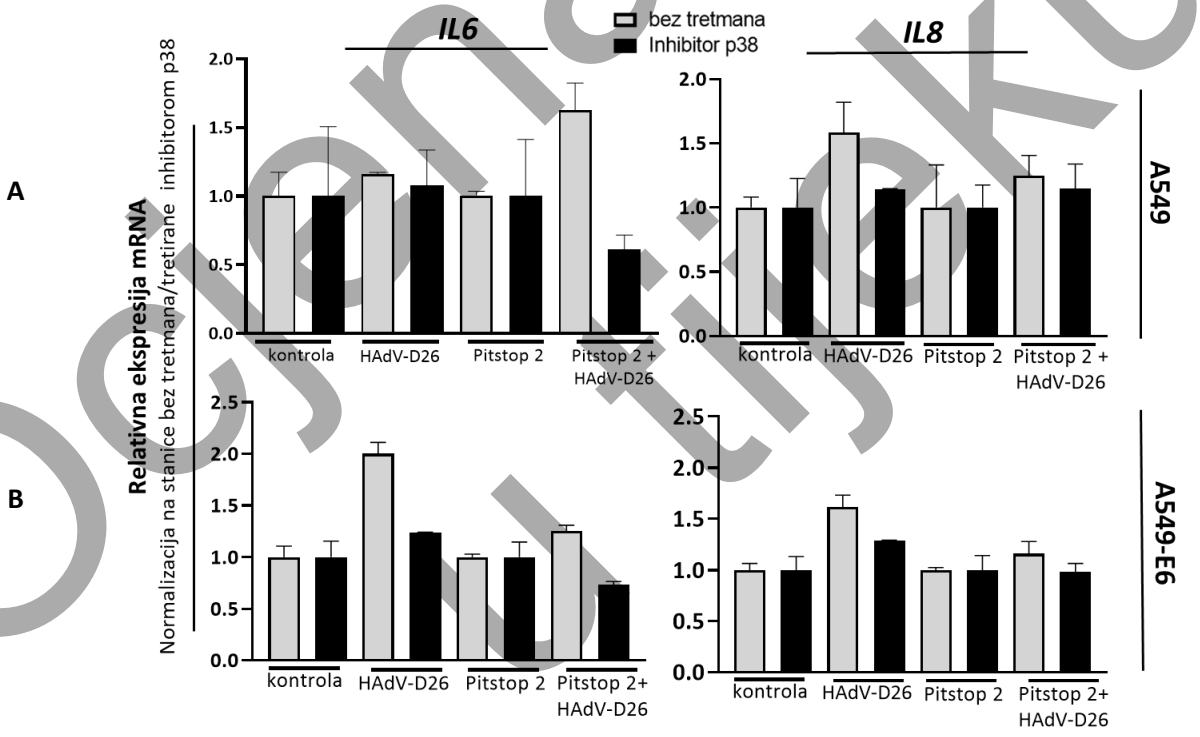
U stanicama A549-E6 inficiranim HAdV-D26, količina fosforiliranog proteina ERK usporediva je s količinom u neinficiranim stanicama A549-E6, dok je kod stanica A549-E6 tretiranih Piststopom 2 i inficiranih HAdV-D26 uočena 1.5 puta veća količina fosforiliranog proteina ERK u odnosu na stanice A549-E6 tretirane Pitstopom 2 (Slika 18). Osim toga, rezultati ukazuju na to da je u stanicama A549-E6 nakon transdukcije HAdV-26 količina fosforiliranog oblika proteina p38 približno pet puta veća u odnosu na količinu u neificiranim stanicama A549-E6. Dodatno, približno četiri puta povećana količina fosforiliranog oblika proteina p38 uočena je u stanicama A549-E6 nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26 u odnosu na količinu u stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom.

Zaključno, protein ERK ne pokazuje značajnu razliku u aktivnosti u stanicama A549 i A549-E6, nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26. Suprotno tome, HAdV-D26 zaustavljen ispod membrane stanice potiče aktivaciju proteina p38 i u stanicama A549 i A549-E6.

Jedan od proteina koji se nalazi nizvodno od p38 u MAPK signalnom putu je i MAP kinaza-aktivirana protein-kinazom 2 (MK2) koja ima središnju ulogu u regulaciji proizvodnje

Ocjena rada u tijeku

upalnih citokina [126]. Kako bi se razjasnila uključenost MK2 u ekspresiji gena *IL6* i *IL8* korišten je inhibitor p38 (SB203580) koji inhibira katalitičku aktivnost p38 čime se sprječava fosforilacija MK2. Rezultati pokazuju da u stanicama A549 inhibicija p38 nema utjecaj na razinu ekspresije *IL6* nakon transdukcije HAdV-D26, no smanjuje razinu ekspresije *IL6* za 2.6 puta nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama tretiranim Pitstopom 2 (slika 19A). Dodatno, inhibicija p38 u stanicama A549 ne mijenja razinu ekspresije *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26, kao ni razinu ekspresije *IL8* puta u stanicama tretiranima Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 (slika 19A). U stanicama A549-E6 inhibicija p38 smanjuje razinu ekspresije *IL6* 1.6 puta nakon transdukcije HAdV-D26 kontrolnih stanica, ali i 1.7 puta nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama tretiranim Pitstopom 2 (slika 19B). Inhibicija p38 u stanicama A549-E6 ne mijenja razinu ekspresije *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26, kao ni razinu ekspresije *IL8* u stanicama A549-E6 tretiranima Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 (slika 19B).



Slika 19. Promjena razine ekspresije gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6, nakon inhibicije p38 inhibitorom SB203580, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. Razina ekspresije gena *IL6* ili *IL8* u stanicama (A) A549 i (B) A549-E6 nakon inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i/ili transdukcije HAdV-D26, 1 sat nakon transdukcije određena je metodom qPCR. Stanice su predtretirane inhibitorom p38 (30 minuta; 37˚C), a zatim je napravljen predtretman inhibitorom Pitstopom 2 s ili bez dodatka inhibitora p38 (30 minuta; 37˚C). Nakon

Ocjena rada u tijeku

toga, stanicama je dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2 i/ili inhibitora p38. Iz skupljenih stanica izolirana je RNA te je metodom qPCR kvantificirana razina ekspresija gena *IL6* i *IL8*. Rezultati su normalizirani prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen *GAPDH*) i i prema kontrolnim stanicama (neificiranim ili netretiranim) unutar skupine s ili bez tretmana inhibitorom p38 te prikazani uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Zaključno, inhibicija p38 nema utjecaj na razinu ekspresije i) *IL6* i *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549, ii) *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549-E6, iii) *IL8* u obje stanične linije tretirane Pitstopom 2 i transducirane HAdV-D26. Međutim inhibicija p38 smanjuje razinu ekspresije *IL6* u stanicama A549-E6 transduciranim HAdV-D26 i u obje stanične linije tretirane Pitstopom 2 i transducirane HAdV-D26. Ovi rezultati dodatno potvrđuju uključenost p38 signalnog puta, odnosno uključenost MK2 u promjeni razine ekspresije *IL6* nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549-E6, te promjene razine ekspresije *IL6* u obje stanične linije u kojima je HAdV-D26 zaustavljen ispod membrane stanice (Tablica 15).

Tablica 15. Promijena razine ekspresije gena *IL6* ili *IL8* u stanicama A594 i A549-E6 s inhibiranim p38, nakon inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i/ili transdukcije HAdV-D26

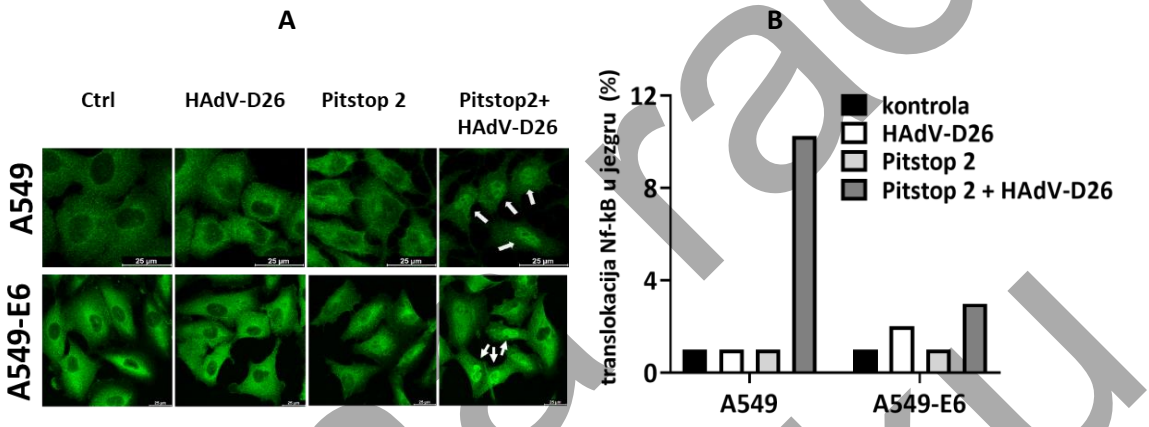
Inhibicija p38		**HAdV-D26**	**HAdV-D26 + Pitstop 2**
A549	*IL6*	**=**	⬇
	IL8	**=**	**=**
A549-E6	*IL6*	⬇	⬇
	IL8	**=**	**=**

3.2.3. Zaustavljanje HAdV-D26 u blizini membrane stanice potiče aktivaciju transkripcijskog faktora NF-κB p65 u stanicama A549 te NF-κB p65 i IRF3 u stanicama A549-E6

Aktivnost kinaza MAPK signalnog puta preduvjet je za unutarstanični prijenos signala i aktivaciju transkripcijskih faktora, poput NF-κB i IRF3, povezanih s ekspresijom interleukina uslijed infekcije virusima [127-130]. S ciljem razumijevanja uključenosti transkripcijskog faktora NF-κB p65 u aktivaciju signalnih puteva povezanih s urođenom imunosti, proučavana je lokalizacija proteina NF-Kb p65 u stanicama A549 i A549-E6 nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26 (Slika 20A). Rezultati pokazuju da transdukcija HAdV-D26 u stanicama A549 ne uzrokuje translokaciju transkripcijskog faktora NF-κB p65

Ocjena rada u tijeku

u jezgru, dok tretman stanica Pitstopom 2 i transdukcija HAdV-D26 potiču translokaciju NF-κB p65 u jezgru, kod 50 % analiziranih stanica (Slika 20B). U stanicama A549-E6 transdukcija HAdV-D26 je potaknula translokaciju NF-κB p65 u jezgru kod tek 2 % analiziranih stanica, ali je kod gotovo 50 % analiziranih stanica A549-E6 tretiranih Pitstopom 2 i inficiranih HAdV-D26 uočena translokacija NF-κB p65 (Slika 20B). Zaključno, tretman stanica A549 i A549-E6 Pitstopom 2 i transdukcija HAdV-D26 potiču aktivnost transkripcijskog faktora NF-κB p65.



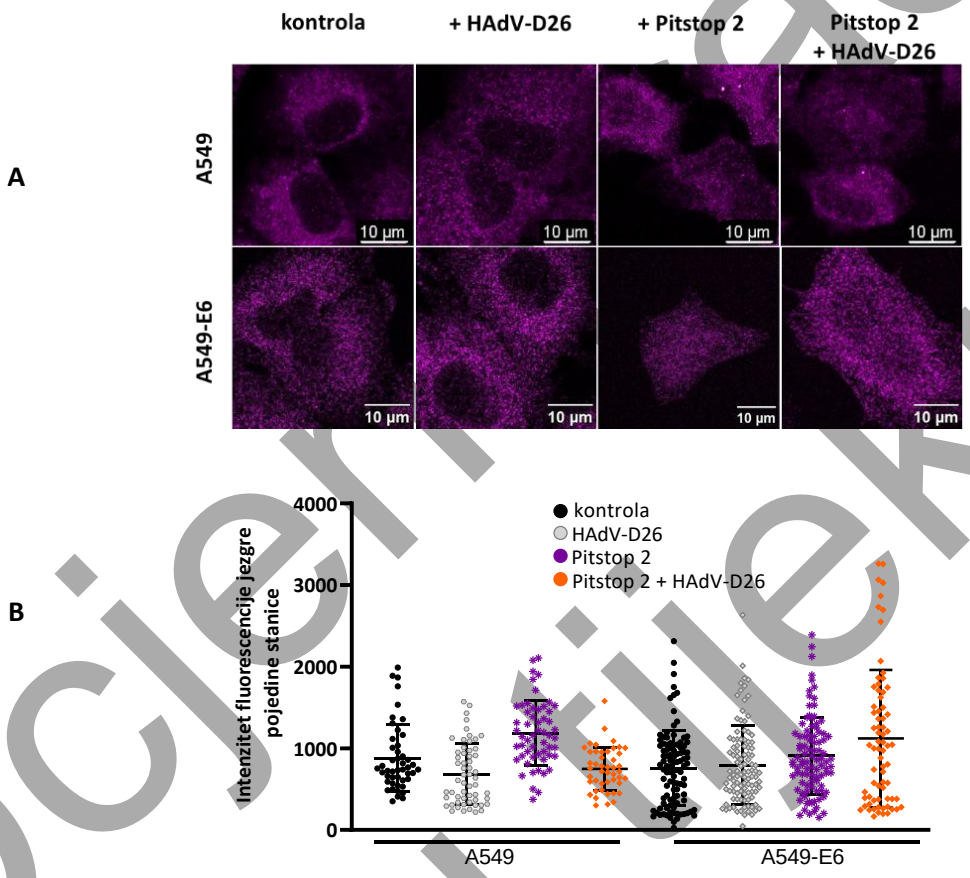
Slika 20. Aktivnost transkripcijskog faktora NF-κB p65 u stanicama A549 i A549-E6, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. (A) Lokalizacija transkripcijskog faktora NF-κB p65 unutar stanica, 1 sat nakon transdukcije praćena je konfokalnom mikroskopijom. Stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2. Nakon ispiranja, stanice su fiksirane (2 % PFA), permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelom NF-κB p65 (1h, 37˚C), a zatim i s flourescentno obilježenim sekundarnim protutijelom (AF488 – zeleno). Bijele strelice pokazuju stanice okarakterizirane kao pozitivne, odnosno stanice kod kojih je vidljiva translokacija proteina NF-κB p65 u jezgru. (B) Kvantifikacija translociranog transkripcijskog faktora NF-κB u stanicama A549 i A549-E6 prikazana kao postotak stanica kod kojih je uočena translokacija proteina NF-κB p65 u odnosu na ukupni broj analiziranih stanica. (*Rezultat prikazan uz dopuštenje kolege dr.sc. Davora Nestića.)*

Kako bi se istražila uključenost transkrpcijskog faktora IRF3 u aktivaciji signalnih puteva povezanih s urođenom imunosti, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26, proučavana je lokalizacija proteina IRF3 u stanicama A549 i A549-E6 (Slika 21A). Rezultati pokazuju da u stanicama A549 postoji usporediva bazalna aktivnost transkripcijskog faktora IRF3 kao i u stanicama A549-E6 (Slika 21B). U stanicama A549 transdukcija HAdV-D26 nije promijenila aktivnost transkripcijskog faktora IRF3, dok je tretman stanica A549

Objena rada u tiskU

Pitstopom 2 i transdukcija HAdV-D26 smanjio aktivnost transkripcijskog faktora IRF3 (Slika 21B). Transdukcija HAdVD-26 u stanicama A549-E6 također nije mijenjala aktivnost transkripcijskog faktora IRF3, ali su tretman stanica Pitstopom 2 i transdukcija HAdV-D26 povećali njegovu aktivnost (Slika 21B).

Zaključno, u stanicama A549-E6 zaustavljanje virusa u blizini membrane stanice, uslijed tretmana Pitstopom 2, potiče aktivnost transkripcijskog faktora IRF3.



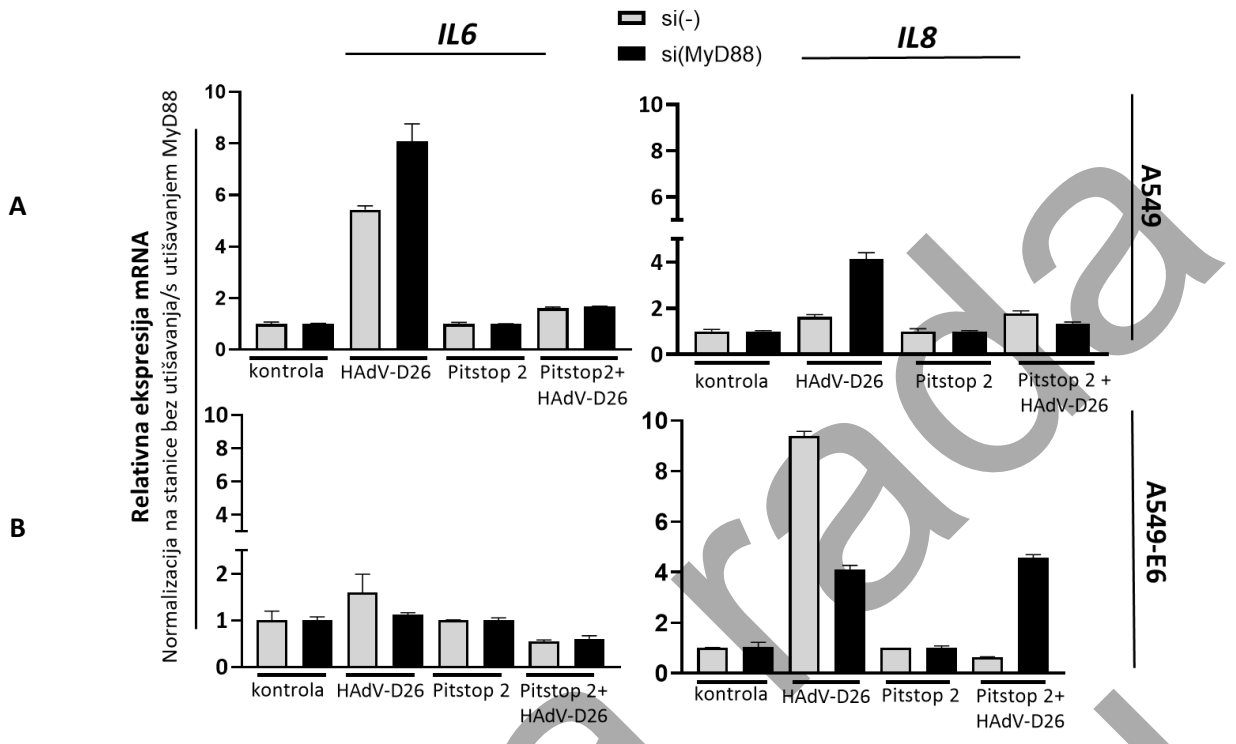
Slika 21. Aktivnost transkripcijskog faktora IRF3 u stanicama A549 i A549-E6, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. (A) Lokalizacija transkripcijskog faktora IRF3 unutar stanica, 1 sat nakon transdukcije praćena je konfokalnom mikroskopijom. Stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2. Nakon ispiranja, stanice su fiksirane (4 % PFA), permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelom IRF3 (24h, 37˚C), a zatim i s flourescentno obilježenim sekundarnim protutijelom (AF647 – magenta). (B) Kvantifikacija translociranog transkripcijskog faktora IRF3 u stanicama A549 i A549-E6 prikazana kao srednja vrijednost intenziteta flouorescencije jezgre pojedine stanice (pojedinačni kružić predstavlja intenzitet fluorescencije jezgre pojedinačne stanice). Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Ocjenski rad u tijeku

3.2.4. Adaptor MyD88 djelomično je uključen u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom gena *IL8* u stanicama A549-E6 transduciranim HAdV-D26

Aktivnost proteina ERK, p38, NF-κB p65 i IRF3 ukazuje na uključenosti TLR-ova u aktivaciju signalnih puteva urođene imunosti. TLR-ovi se mogu nalaziti na membrani stanice, ali i unutar endosoma [59, 131]. U literaturi je nekoliko TLR-ova povezano s prepoznavanjem adenovirusa, pri čemu se ističe TLR9 koji prepoznaje dvolančanu molekulu DNA, a nalazi se unutar endosoma [56, 57]. Primarna ideja ovog istraživanja bila je utišati TLR9 te pratiti promjene na razini ekspresije i lučenja IL6 i IL8, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. S obzirom da utišavanje TLR9 nije bilo uspješno, odlučeno je utišati protein MyD88, adaptor koji je nužan za prijenos signala nizvodno svim TLR-ovima, osim TLR3. Dobiveni rezultati pokazuju da utišavanje adaptora MyD88 u stanicama A549 uzrokuje povećanu razinu ekspresiju *IL6* za 1.5 puta nakon transdukcije HAdV-D26 u odnosu na stanice A549 koje su transducirane, ali su imale nepromijenjenu količinu adaptora MyD88 (Slika 21A). U stanicama A549, utišavanje adaptora MyD88, nije pridonijelo promjeni razine ekspresije *IL6* nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26, u odnosu na stanice A549 koje su bile samo tretirane Pitstopom 2 (Slika 22A). Razina ekspresija *IL8* bila je povećana 2.5 puta nakon utišavanja adaptora MyD88 u stanicama A549 inficiranim HAdV-D26 u odnosu na stanice A549 koje su bile transducirane, ali su imale nepromijenjenu količinu adaptora MyD88 (Slika 22A) dok je razina ekspresije *IL8* bila nepromijenjena nakon utišavanja adaptora MyD88 u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 (Slika 22A). U stanicama A549-E6, utišavanje adaptora MyD88 nije promijenilo razinu ekspresije *IL6* nakon transdukcije HAdV-D26 u odnosu na stanice A549-E6 koje su bile transducirane HAdV-D26, ali nisu imale promijenjenju količinu adaptora MyD88 (Slika 22B). Suprotno tome, smanjenje razine ekspresije gena *IL8* od 2.2 puta uočeno je nakon utišavanja adaptora MyD88 u stanicama A549-E6 transduciranim HAdV-D26 (Slika 22B). Dodatno, u stanicama A549-E6, utišavanje adaptora MyD88 nije utjecalo na razinu ekspresije *IL6* (Slika 22B), ali je povećalo razinu ekspresije *IL8* za 7.2 puta nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26 (Slika 22B). Zaključno, adaptor MyD88 uključen je u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom *IL8* u stanicama A549-E6 transduciranim HAdV-D26.

Ocjena rada u tijeku

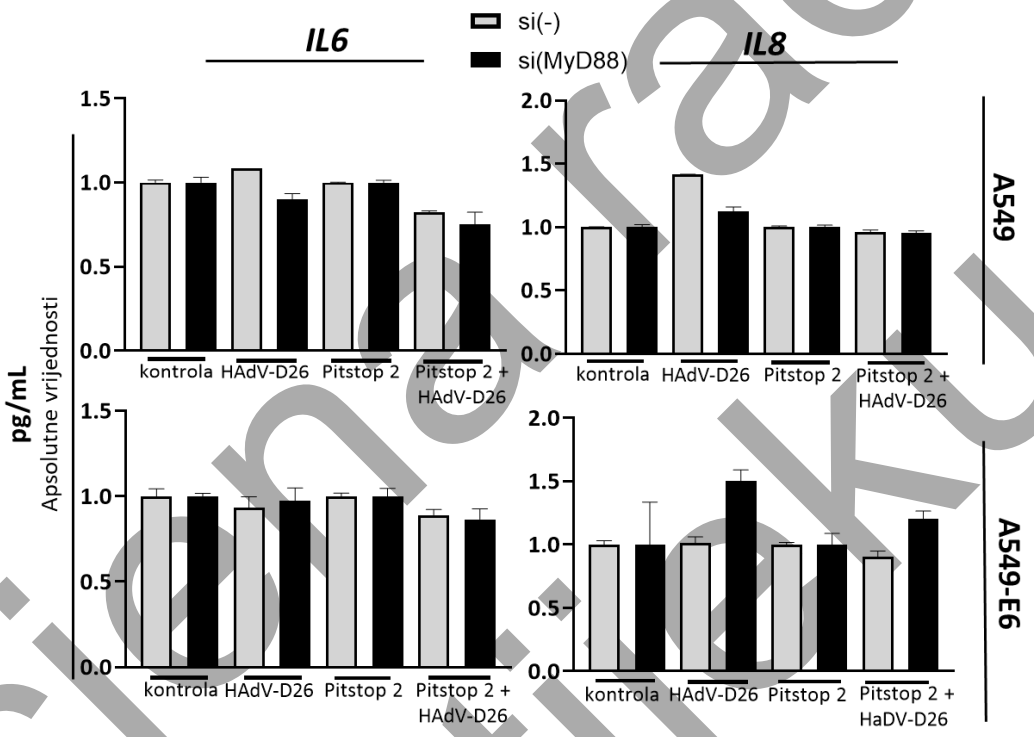


Slika 22. Promjena razine ekspresije gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6, nakon utišavanja adaptora MyD88, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. Razina ekspresije gena *IL6* ili *IL8* u stanicama (A) A549 i (B) A549-E6 s utišanim proteinom MyD88 nakon tretmana stanica inhibitorom Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26, 1 sat nakon transdukcije određena je metodom qPCR. Nakon utišavnja proteina MyD88 u stanicama (48 h; 37˚C) korištenjem specifične siRNA, stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pitstopa 2. Iz skupljenih stanica izolirana je RNA te je metodom qPCR kvantificirana razina ekspresija gena *IL6* i *IL8*. Rezultati su normalizirani prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen *GAPDH*) i prema kontrolnim stanicama unutar skupine (neificiranim HAdV-D26 ili netretiranim Pitstopom 2) s utišavanjem MyD88 (si (MyD88)) ili bez utišavanja (si (-)) te prikazani uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Kako bismo istražili hoće li uočena promijenjena razina ekspresije *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6 rezultirati i promijenjenom količinom izlučenih proteina IL6 i IL8, napravljena je metoda ELISA. Rezultati su pokazali da utišavanje MyD88 u stanicama A549 ne mijenja lučenje proteina IL6 i IL8, nakon transdukcije HAdV-D26 (slika 23A), iako je ranije pokazano da utišavanje MyD88 u stanicama A549 nakon transdukcije HAdV-D26 uzrokuje snažniju razinu ekspresije oba gena, *IL6* i *IL8* (slika 22A). Dodatno, utišavanje adaptora MyD88 u stanicama A549 nije promijenilo količinu IL6 i IL8 nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26 (slika 23A). U stanicama A549-E6 utišavanje adaptora MyD88 nije utjecalo na količine izlučenog proteina IL6, kako u stanicama transduciranim HAdV-D26,

Ocjena rada u tijeku

tako ni u stanicama tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 (slika 23B). Međutim, utišavanje adaptora MyD88 u stanicama A549-E6, potaknulo je snažnije lučenje proteina IL8 za 1.5 puta nakon transdukcije HAdV-D26 (slika 23B) što je zanimljivo, budući da je ranije pokazano da utišavanje adaptora MyD88 u stanicama A549-E6 smanjuje razinu eskpresije *IL8* nakon transdukcije (slika 22B). Nepromijenjeno lučenje proteina IL8 nakon utišavanja adaptora MyD88, u stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26, ne prati ranije pokazanu povećanu razinu ekspresije *IL8* (slika 22B).



Slika 23. Količina izlučenih proteina IL6 i IL8 u stanicama (A) A549 i (B)A549-E6 s utišanim adaptorom MyD88, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. Nakon utišavanja proteina MyD88 u stanicama (48 h; 37˚C) korištenjem specifične siRNA, stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pitstopa 2. Nakon dodatka svježeg medija, stanice su inkubirane 24 h, a zatim je skupljen supernatant koji je korišten u ELISI. Količina izlučenih citokina izračunata je ekstrapolacijom iz krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Zaključno, utišavanje adaptora MyD88 u stanicama A549-E6 smanjuje razinu ekspresije gena *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26, ali povećava lučenje proteina IL8 nakon transdukcije HAdV-D26. Ovi rezultati pokazuju djelomičnu uključenost MyD88 proteina u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom i lučenjem IL8 (Tablica 16).

Original rada u tiskanom obliku

Tablica 16. Promjena razine ekspresije gena IL6 ili IL8 i količine izlučenih proteina IL6 i IL8 u stanicama A594 i A549-E6 s utišanim MyD88, nakon inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i/ili transdukcije HAdV-D26

		HAdV-D26		HAdV-D26 + Pitstop 2	
Utišavanje MyD88		Razina ekspresije	Količina izlučenih proteina	Razina ekspresije	Količina izlučenih proteina
A549	*IL6*	⬆	=	=	=
	IL8	⬆	=	=	=
A549-E6	*IL6*	=	=	=	=
	IL8	⬇	⬆	⬆	=

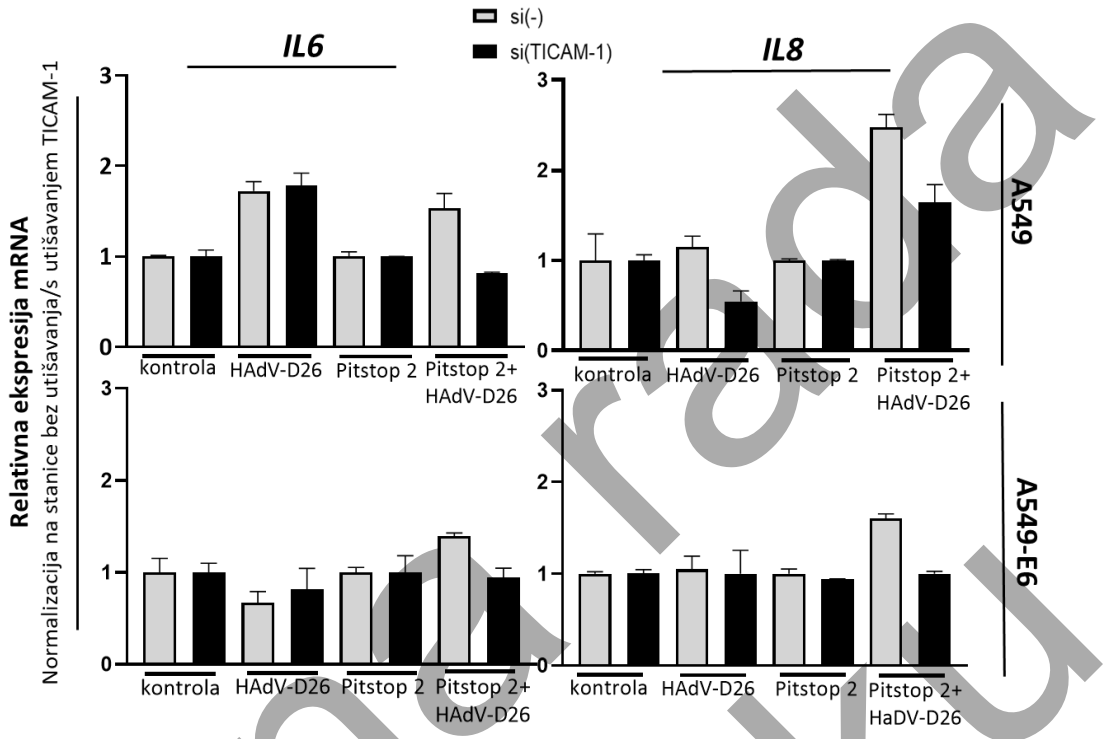
4.2.5. Razina ekspresije gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6 u kojima je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane, kao i *IL8* nakon infekcije HAdV-D26 u stanicama A549, djelomično ovisi o adaptoru TICAM-1

Utišavanjem adaptorskog proteina MyD88 pokazana je njegova tek djelomična uključenost u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom gena *IL8* u stanicama A549-E6. Iako većina TLR-ova koristi adaptor MyD88 za prijenos signala nizvodno, TLR3 i TLR4 mogu prenositi signale neovisno o adaptoru MyD88, koristeći adaptor TICAM-1 [132]. Kako bi se istražilo da li su TLR3 ili TLR4 uključeni u prepoznavanje HAdV-D26 nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26, određena je ekspresija *IL6* i *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26 stanicama u kojima je specifično utišan adaptor TICAM-1. Rezultati pokazuju da utišavanje adaptora TICAM-1 u stanicama A549 ne mijenja razinu ekspresije *IL6* nakon transdukcije HAdV-D26 (slika 24A), dok je razina ekspresije *IL8* smanjena 2.1 puta (slika 24A) u odnosu na kontrolne stanice A549 transducirane HAdV-D26 u kojima je količina adaptora TICAM-1 nepromijenjena. U stanicama A549, utišavanje adaptora TICAM-1 smanjuje razinu ekspresije *IL6* 1.8 puta i *IL8* 1.5 puta nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26 (slika 24A). Utišavanje adaptora TICAM-1 ne mijenja razinu ekspresije *IL6* u stanicama A549-E6 nakon transdukcije HAdV-D26 (Slika 23B), kao ni razinu ekspresije *IL8* (Slika 24B). Razina ekspresije *IL6*, smanjena je 1.5 puta nakon utišavanja adaptora TICAM-1, u stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26, a sličan učinak smanjenja od 1.6 puta vidljiv je i kod ekspresije *IL8* (Slika 24B).

Zaključno, adaptor TICAM-1 djelomično je uključen u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom *IL6* i *IL8* u obje stanične linije u kojima je HAdV-D26 zaustavljen u blizini

Ocjena rada u tijeku

membrane stanice. Osim toga, i u stanicama A549 transduciranim HAdV-D26 uočena je djelomična ovisnost ekspresije *IL8* o adaptoru TICAM-1 (Tablica 17).

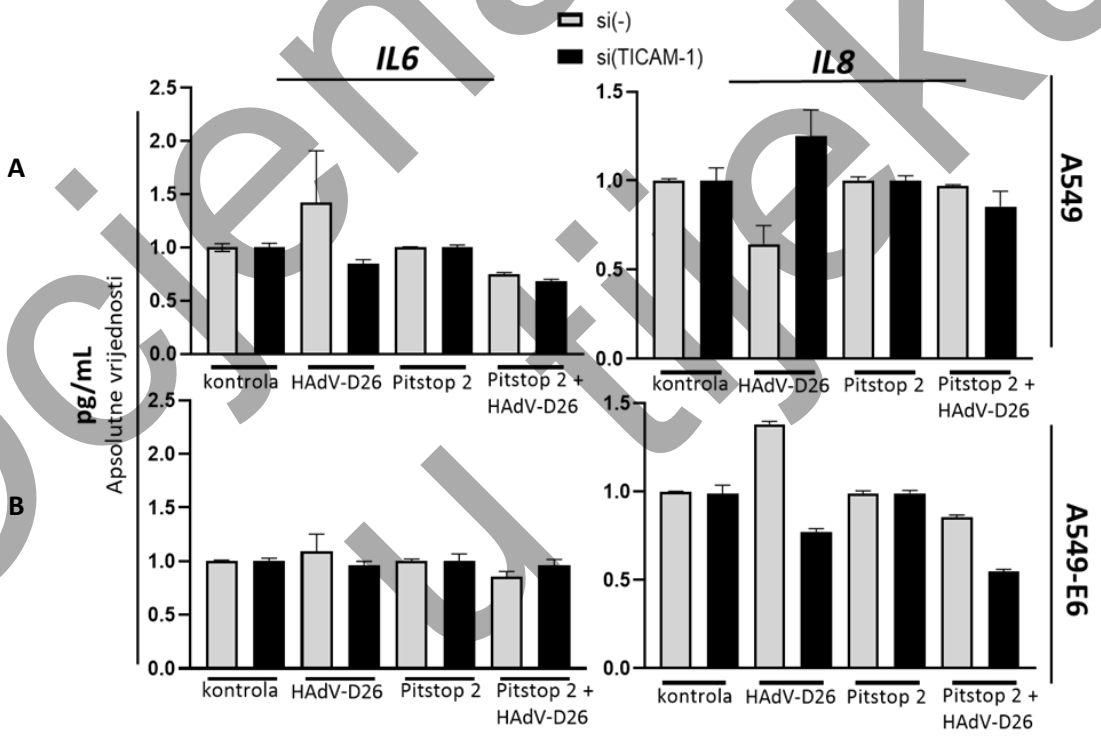


Slika 24. Promjena razine ekspresije gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6, nakon utišavanja adaptora TICAM-1, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. Razina ekspresije gena (A) *IL6* ili (B) *IL8* u stanicama A549 i A549-E6 s utišanim TICAM-1 proteinom, 1 sat nakon transdukcije određena je metodom qPCR. Nakon utišavnja proteina TICAM-1 u stanicama (48 h; 37˚C) korištenjem specifične siRNA, stanicama je dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C). Iz skupljenih stanica izolirana je RNA te je metodom qPCR kvantificirana ekspresija gena *IL6* i *IL8*. Rezultati su normalizirani prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen *GAPDH*) prema kontrolnim stanicama (neificiranim ili netretiranim) unutar skupine s ili bez utišavanja TICAM-1 te prikazani uz standardna odstupanja. Razina ekspresije gena (C) *IL6* ili (D) *IL8* nakon tretmana stanica inhibitorom Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549 i A549-E6 s utišanim TICAM-1 proteinom, 1 sat nakon transdukcije određena je metodom qPCR. Nakon utišavnja proteina TICAM-1 u stanicama (48 h; 37˚C) korištenjem specifične siRNA molekule, stanice su predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2. Iz skupljenih stanica izolirana je RNA te je metodom qPCR kvantificirana ekspresija gena *IL6* i *IL8*. Rezultati su normalizirani prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen *GAPDH*) prema kontrolnim stanicama (neificiranim ili netretiranim) unutar skupine s ili bez utišavanja TICAM-1 te prikazani uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Kako bismo istražili hoće li uočena smanjena razina ekspresije *IL6* i *IL8* nakon utišavanja adaptora TICAM-1, u stanicama A549 i A549-E6 rezultirati i smanjenom količinom izlučenih

Osijek rada Ujiek

proteina IL6 i IL8, napravljena je metoda ELISA. Rezultati su pokazali da utišavanje TICAM-1 u stanicama A549 ne mijenja lučenje IL6 nakon transdukcije HAdV-D26 (slika 25A). Osim toga, utišavanje adaptora TICAM-1 u stanicama A549 transduciranim HAdV-D26 povećava lučenje IL8 gotovo 2 puta (slika 25A), iako je ranije pokazano da je razina ekspresije *IL8* u tom uvjetu smanjena (slika 24A). Dodatno, utišavanje adaptora TICAM-1 u stanicama A549 nije promijenilo količinu IL6 i IL8 nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26 (slika 25A) iako je ranije pokazana smanjena ekspresija oba gena (slika 24A). U stanicama A549-E6, utišavanje adaptora TICAM-1 nije utjecalo na količine izlučenog proteina IL6, kako u stanicama transduciranim HAdV-D26, tako ni u stanicama tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 (slika 25B). Međutim, utišavanje adaptora TICAM-1 u stanicama A549-E6, smanjilo je lučenje proteina IL8 za 1.7 puta nakon transdukcije HAdV-D26 (slika 25B) iako je ranije pokazano da je razina ekspresije gena *IL8* nepromijenjena (slika 24B). Smanjeno lučenje proteina IL8 za 1.5 puta, nakon utišavanja adaptora TICAM-1, uočeno je u stanicama A549-E6 i nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26 (slika 25B).



Slika 25. Količina izlučenih proteina IL6 i IL8 u stanicama A549 i A549-E6 s utišanim adaptorom TICAM-1, nakon tretmana Pitstopom 2 i/ili transdukcije HAdV-D26. Količina IL6 ili IL8 u stanicama (A) A549 i (B) A549-E6 s utišanim proteinom TICAM-1 nakon tretmana stanica inhibitorom Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26, 1 sat nakon transdukcije određena je metodom ELISA. Nakon utišavnja proteina TICAM-1 u stanicama (48 h; 37˚C) korištenjem specifične siRNA, stanice su

Ocjena rada u tijeku

predtretirane inhibitorom Pitstopom 2 (30 minuta; 37˚C). Stanicama je zatim dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pitstopa 2. Nakon dodatka svježeg medija, stanice su inkubirane 24 h, a zatim je skupljen supernatant. Količina izlučenih citokina izračunata je ekstrapolacijom iz krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Zaključno, utišavanje adaptora TICAM-1 u stanicama A549 smanjuje razinu ekspresije *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26 te ekspresiju oba gena, *IL6* i *IL8*, nakon tretmana Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26. Iako je u stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 nakon utišavanja adaptora TICAM-1 uočena smanjena razina ekspresije *IL6*, količina izlučenog IL6 ostala je nepromijenjena (Tablica 17.) Razina ekspresije *IL8,* u stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 nakon utišavanja adaptora TICAM-1 bila je smanjena, a dodatno je uočeno i smanjeno lučenje IL8 (Tablica 17).

Tablica 17. Promjena razine ekspresije gena *IL6* ili *IL8* i količine izlučenih proteina IL6 i IL8 u stanicama A594 i A549-E6 s utišanim TICAM-1, nakon inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i/ili transdukcije HAdV-D26

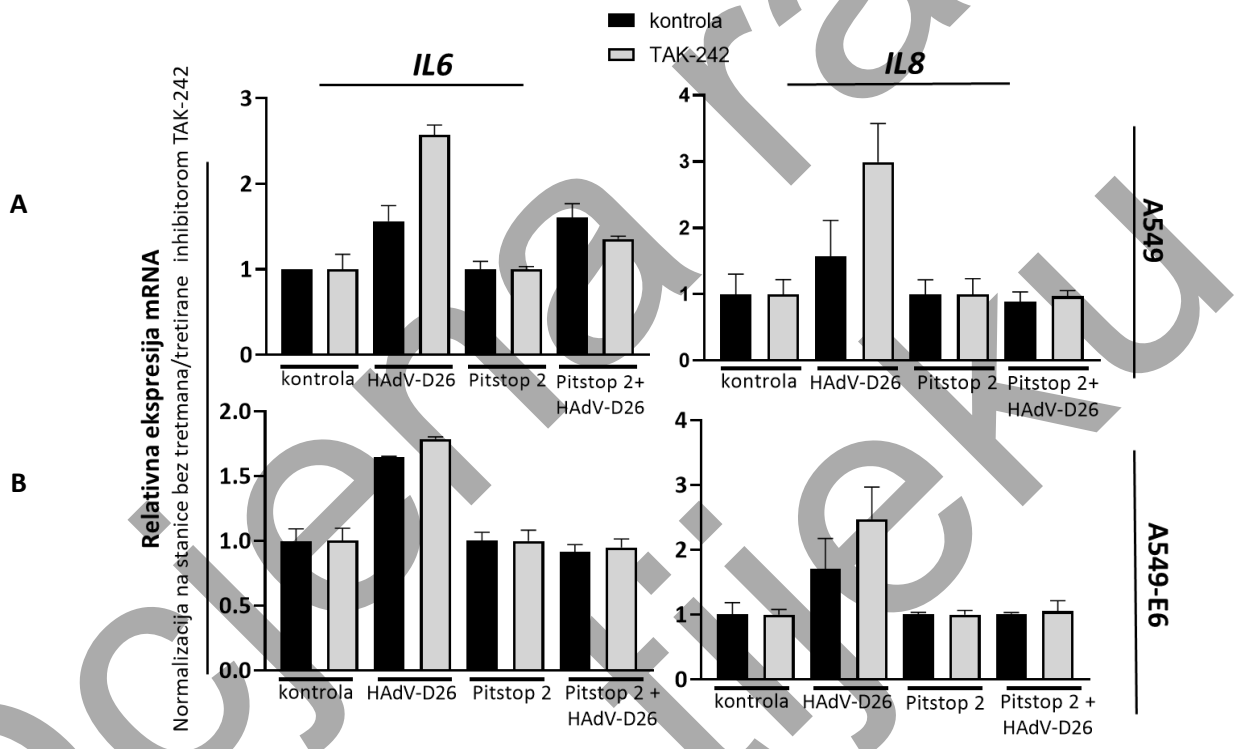
		HAdV-D26		**HAdV-D26 + Pitstop 2**	
Utišavanje TICAM-1		Razina ekspresije	Količina izlučenih proteina	Razina ekspresije	Količina izlučenih proteina
A549	*IL6*	=	=	⬇	=
	IL8	⬇	⬆	⬇	=
A549-E6	*IL6*	=	=	⬇	=
	IL8	=	⬇	⬇	⬇

4.2.6. Ekspresija gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6, u kojima je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane stanice, ne ovisi o TLR4

Djelomična uključenost adaptora TICAM-1 sugerira uključenost TLR3 ili TLR4 u aktivaciji signalnih puteva povezanih s ekspresijom gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6 nakon transdukcije HAdV-D26. S ciljem razlikovanja uključenosti TLR3, odnosno, TLR4 u prepoznavanju HAdV-D26 određena je razina ekspresije *IL6* i *IL8* u stanicama tretiranima inhibitorom TLR4 (TAK-242) koji zaustavlja prijenos signala posredovan adaptorom MyD88 i adaptorom TICAM-1, ali ne sprječava vezanje liganda za TLR4. Ovim pristupom, smanjenje razine ekspresije *IL6* ili *IL8* ukazat će na uključenost TLR4 u prepoznavanje HAdV-D26, dok će nepromijenjena ekspresija *IL6* i *IL8* sugerirati o uključenosti TLR3 u prepoznavanju

Ocjena rada u tijeku

HAdV-D26. Dobiveni rezultati pokazuju da je u stanicama A549 transduciranim HAdV-D26 inhibicija TLR4 povećala ekspresiju *IL6* za 1.6 puta i *IL8* za 1.9 puta (slika 26A) u odnosu na stanice A549 transducirane HAdV-D26 koje nisu bile tretirane inhibitorom TLR4. Inhibicija TLR4 u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 nije utjecala na razinu ekspresije *IL6* (slika 26A), kao ni na razinu ekspresije *IL8* (slika 26A). U stanicama A549-E6 inhibicija TLR4 nije promijenila ekspresiju *IL8* ni *IL6* nakon transdukcije HAdV-D26 (slika 26B). Također, ni u stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 inhibicija TLR4 nije imala utjecaj na razinu ekspresije *IL6* i *IL8* (slika 26B).



Slika 26. Promjena razine ekspresije gena *IL6* i *IL8* u stanicama A549 i A549-E6 s inhibiranim TLR4 (inhibitor TAK-242), nakon inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i/ili transdukcije HAdV-D26. Razina ekspresije gena *IL6* ili *IL8* u stanicama (A) A549 i (B) A549-E6 s inhibiranim p38, nakon tretmana stanica inhibitorom Pitstopom 2 i transdukcije HAdV-D26, 1 sat nakon transdukcije određena je metodom qPCR. Stanice su prvo predtretirane inhibitorom p38 (30 minuta; 37˚C), a zatim je napravljen predtretman inhibitorom Pitstopom 2 s ili bez dodatka inhibitora p38 (30 minuta; 37˚C). Nakon toga, stanicama je dodan HAdV-D26 (MOI 10^4; 1h, 37˚C) u mediju s ili bez inhibitora Pistopa 2 i/ili inhibitora p38. Iz skupljenih stanica izolirana je RNA te je metodom qPCR kvantificirana ekspresija gena *IL6* i *IL8*. Rezultati su normalizirani prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen *GAPDH*) i i prema kontrolnim stanicama (neificiranim ili netretiranim) unutar skupine s ili bez tretmana inhibitorom p38 te prikazani uz standardna odstupanja. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Ocjena rada u tijeku

Zaključno, uloga TLR4 u aktivaciji signalnih puteva povezanih s ekspresijom *IL6* i *IL8*, nije uočena ni u stanicama A549 kao ni u A549-E6. Zanimljivo, u stanicama A549 s utišanim adaptorom TICAM-1 u uvjetu zaustavljanja HAdV-D26 u blizini membrane, kod kojeg je ranije uočeno smanjenje razine ekspresije *IL6* i *IL8* (slika 24A), inhibicija TLR4 nije promijenila razinu ekspresije što upućuje na djelomičnu uključenost TLR3 u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom *IL6* i *IL8*. Vrlo sličan zaključak može se izvesti i kod stanica A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 i transduciranim HAdV-D26 nakon utišavanja adaptora TICAM-1 u kojima je ranije uočeno smanjenje ekspresije oba gena (slika 24B), dok inhibicija TLR4 to nije promijenila što upućuje na uključenost TLR3 u prepoznavanje HAdV-D26 i aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom *IL6* i *IL8* (tablica 18).

Tablica 18. Promijena količine izlučenog IL6 ili IL8 u stanicama A594 i A549-E6 s inhibiranim TRL4, nakon inhibicije klatrinom-posredovane endocitoze i/ili transdukcije HAdV-D26

Utišavanje TICAM-1		**HAdV-D26**	**HAdV-D26 + Pitstop 2**
A549	*IL6*	↑	**=**
	IL8	↑	**=**
A549-E6	*IL6*	**=**	**=**
	IL8	**=**	**=**

Ocjena rada u tijeku

5. Rasprava

Ocjena rada u tijeku

Vektori temeljeni na adenovirusima najčešće se koriste u terapiji tumora i u razvoju cjepiva [44]. Iako je HAdV-C5 najistraženiji adenovirus, njegova terapijska primjena kod ljudi ograničena je zbog prethodne izloženosti virusu i razvijenog imuniteta kod većine svjetske populacije. To se negativno odražava na učinkovitost dostave željenog gena u ciljne stanice ili rezultira nedovoljno snažnim imunosnim odgovorom nakon cijepljenja. Ipak, potencijal adenovirusnih vektora za terapijsku primjenu kod ljudi nije odbačen, već su istraživački napori usmjereni prema manje poznatim, ali niskoseroprevalentnim adenovirusima, među kojima se nalazi i HAdV-D26. Dosadašnja *in vivo* istraživanja pokazala su izvrsna svojstva vektora temeljenih na HAdV-D26, a njegovu kliničku važnost potvrđuju i tri odobrena cjepiva – jedno protiv ebole (*Zabdeno*) [133] te dva cjepiva protiv COVID-19, *Jcovden [134]* i *Sputnik V [135]*, pri čemu se *Sputnik V* sastoji od dvije komponente, jedne temeljene na HAdV-D26, a druge na HAdV-C5. Osim toga, cjepivo protiv malarije temeljeno na HAdV-D26 trenutačno je u ranoj fazi kliničkog ispitivanja. Unatoč ovim uspjesima, osnovna biologija HAdV-D26 još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.

Poznato je da adenovirusi pokazuju raznolik tropizam, te da u različite tipove stanica ulaze različitim mehanizmima, koristeći različite receptore. U našem prethodnom istraživanju identificiran je receptor i mehanizam ulaska HAdV-D26 u epitelne stanice čovjeka. Rezultati su ukazali na važnu ulogu integrina αvβ3 u transdukciji epitelnih stanica, kao i na činjenicu da HAdV-D26 koristi različite mehanizme ulaska u stanice A549 i A549-E6 koje se razlikuju u količini integrina αvβ3 [81, 82]. Nadalje, pokazano je da je tretman stanica Pitstopom 2 potaknuo bolju internalizaciju, ulazak i transdukciju HAdV-D26, dok je ekspresija integrina αvβ3 na površini stanica A549 ostala nepromijenjena. Konfokalnom mikroskopijom, također je uočeno da se HAdV-D26 tijekom tretmana stanica Pitstopom 2 zadržavao u u blizini stanične membrane [136]. Iz literature je poznato da rana interakcija između adenovirusa i stanice - putem receptora, uvelike određuje unutarstanično putovanje virusa [114], stoga je u ovom radu pretpostavljeno da promijenjena endocitoza, bilo zbog vezanja receptora integrina αvβ3 ili zbog uključenosti drugačijih molekula odgovornih za endocitozu kod stanica A549 i A549-E6 može utjecati na unutarstanično putovanje HAdV-D26.

Ocjena rada u tijeku

Na temelju navedenog, cilj prvog dijela ove disertacije bio je objasniti funkcionalnu ulogu endosoma u unutarstaničnom putovanju, ali i uspješnosti transdukcije. S obzirom na složenost endosomalnog sustava, istraživanje unutarstaničnog putovanja podijeljeno je na dva dijela. U prvom dijelu istraživanja okarakterizirani su endosomi unutar kojih se HAdV-D26 tijekom vremena nalazio u stanicama A549 i stanicama A549-E6. Dodatno, proučavan je i model u kojem su stanice A549 tretirane Pitstopom 2 (inhibitor klatrinom-posredovane endocitoze) pri čemu je HAdV-D26 zaustavljen u u blizini membrane stanice. Budući da je Pitstop 2 reverzibilan inhibitor [137], praćeno je unutarstanično putovanje HAdV-D26 tijekom oporavka, nakon uklanjanja inhibitora. Ovdje je potrebno napomenuti da je pokazano da Pitstop 2 zaustavlja klatrinom-posredovanu endocitozu na nespecifičan način, odnosno da postoje dvojbe oko točnog mehanizma djelovanja, no ove nedoumice uz vezno mjesto Pitstopa 2 na klatrin nisu bile od interesa u ovom istraživanju [138]. S obzirom na to da je unutarstanično putovanje endosoma, u kojima se nakon endocitoze nalaze i adenovirusi, regulirano GTP-azama Rab koje se na membranama izmijenjuju ovisno o fazi sazrijevanje endosoma, u drugom dijelu istraživanja unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 naglasak je bio na proteinima Rab i njihovoj ulozi u unutarstaničnom putovanju i transdukciji HAdV-D26.

Vezanjem adenovirusa za receptor na površini stanice započinje proces endocitoze kojim virus ulazi u stanicu. Nakon ulaska, adenovirusi se nalaze u endosomima koji se razlikuju ovisno o pH vrijednosti i proteinskom sastavu zbog čega ih je moguće razlikovati. Za rane endosome karakterističan je marker EEA1, dok je za kasni endosome/lizosom karakterističan marker LAMP1. Kako bi se razjasnilo unutarstanično putovanje HAdV-D26, konfokalnom mikroksopijom praćena je kolokalizacija fluorescentno obilježenog HAdV-D26, odnosno, preklapanje fluorescentnih signala virusa i markera ranog endosoma, EEA1, ili markera kasnog endosoma/lizosoma, LAMP1. Rezultati unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 u stanicama A549 pokazuju da HAdV-D26 tijekom prva četiri sata transdukcije putuje unutar ranog ili kasnog endosoma/lizosoma, pri čemu je primjećeno da tijekom prva dva sata transdukcije približno 20 % HAdV-D26 nije prisutno ni u ranom ni u kasnom endosomu/lizosomu, što upućuje na to da je tek manja količina virusa izašla iz endosoma. Suprotno tome, poznato je da HAdV-C5 gotovo sav izlazi iz endosoma unutar prvih sat vremena transdukcije [97]. Tijekom prvih pola sata trandukcije, većina HAdV-D26 je

Ocjena rada u tijeku

lokalizirana u ranom endosomu. S vremenom se njegova lokalizacija u ranim endosomima smanjuje, uz istovremeno povećanje lokalizacije u kasnim endosomima/lizosomima. Zanimljivo, približno 50 % HAdV-D26, dva do četiri sata nakon transdukcije, nalazi se u kasnom endosomu/lizosomu iz kojeg ne izlazi. Izvedeni zaključak da HAdV-26 u stanicama A549 zaostaje u kasnom endosomu/lizosomu dodatno potvrđuju i podaci iz literature. Naime pokazano je zaostajanje vektora temeljenog na HAdV-26 u kasnim endosomima u epitelnim stanicama adenocarcinoma pluća čovjeka [139]. Zaustavljanje u lizosomima je pokazano i za adenovirus tipa 7 iz grupe B i to u epitelnim stanicama adenokarcinoma vrata maternice [140].

Iako je za očekivati da LAMP1, marker kasnog endosoma, i HAdV-D26 neće kolokalizirati u vrlo ranoj fazi transdukcije ipak je uočena njihova lokalizacija. Prema podacima iz literature takav ishod nije neobičan jer je pokazano da endosomi vrlo brzo nakon formiranja mogu poslužiti kao akceptori novo sintetiziranog proteina LAMP1 [141], što može objasniti uočenu kolokalizaciju LAMP1 i približno 30 % HAdV-D26 u stanicama A549 u prvih 30 minuta infekcije.

U modelu stanica A549 u kojima je usljed tretmana Pitstopom 2 inhibirana klatrinom-posredovana endocitoza, primjećeno je da je potrebno približno 30 minuta dulje da bi većina virusa bila lokalizirana u ranom endosomu u odnosu na lokalizaciju virusa uočenu u netretiranim stanicama A549. Razlog tome može biti u protokolu. Naime, tijekom prvih 10 minuta transdukcije, zbog djelovanja Pitstopa 2 virus ne putuje unutar stanice. Tek nakon uklanjanja inhibitora i dodatka svježe hranjive podloge, aktivnost inhibitora postepeno slabi i virus počinje neometano putovati što može biti uočeno kao vremenski pomak u dinamici putovanja HAdV-D26. No, uočeno je da je u tretiranim stanicama A549 količina HAdV-D26 u ranom endosomu općenito manja nego u stanicama A549. Dodatno, u stanicama tretiranim Pitstopom 2 manje HAdV-D26 lokalizira u kasnom endosomu/lizosomu u odnosu na stanice A549 što uklazuje da inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze mijenja unutarstanično putovanje HAdV-D26. Ovo može također biti i jedan od razloga ranije uočene uspješnije transdukcije HAdV-D26 nakon tretmana Pitstopom 2 [82]. Zanimljivo je da ukupnu količina virusa lokaliziranu u ranom ili kasnom endosmu/lizosomu u prvih 30 minuta transdukcije čini tek 66 % analiziranih virusa, a nakon sat vremena gotovo 90 % analiziranih virusa nalazi se u jednom od endosoma. Takvi

Ocjena rada u tijeku

rezultati sugeriraju da tretman stanica Pitstopom 2, uslijed povećane količine internaliziranog virusa [81], potencijalno aktivira i neke druge mehanizme ulaska neovisne o prisutnosti markera ranog endosoma EEA1. Primjer ulaska u stanicu neovisno o EEA1 u literaturi je poznat za adenovirus tipa 37, također iz grupe D adenovirusa [31]. Dodatno, pokazano je da adenovirus tipa 2 ulazi u epitelne stanice adenokarcinoma vrata maternice klatrinom-posredovanom endocitozom, pri čemu istovremeno aktivira i ulazak putem makropinocitoze, a sadržaj tako formiranih makropinosoma zatim se oslobađa u citosol [91]. Za adenviruse tipa 2 i 5 utvrđena je povezanost klatrinom-posredovane endocitoze i fagocitoze. Naime, inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze nije zaustavila fagocitozu, ali je onemogućila bijeg adenovirusa iz fagosoma, što sugerira da adenovirusi unutar klatrinom-obloženih mjehurića mogu potaknuti signalne puteve neophodne za lizu fagosoma [142]. Ako se u obzir uzmu rezultati naših prethodnih istraživanja koji ukazuju da tretman stanica A549 Pitstopom 2 povećava transdukciju, može se zaključiti da inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze u manjoj mjeri omogućava ulazak virusa na način neovisan o EEA1, a koji međutim osigurava uspješniju transdukciju.

U stanicama A549-E6 uočeno je da HAdV-D26 također putuje u ranom i kasnom endosomu/lizosmu tijekom vremena, te da približno 15 % virusa izađe u citosol iz endosoma tijekom prva dva sata transdukcije, što je manje nego u stanicama A549. Zanimljivo, prethodni rezultati pokazali su da je transdukcija HAdV-D26 u stanicama A549-E6 približno šest puta bolja nego u stanicama A549 [81]. Dva su potencijalna objašnjenja. Prvo, pola sata nakon transdukcije u stanicama A549-E6 oko 10 % virusa nije lokalizirano ni u jednom od endosoma što može ukazivati da su u stanicu ušli drugačijim mehanizmom, neovisnim o EEA1, a koji virusu omogućuje uspješnu dostavu genetičkog materijala u jezgru stanice domaćina. Drugi razlog može biti i to što HAdV-D26 u stanicama A549-E6 brže izlazi iz kasnog endosoma/lizosoma između 60 i 120 min transdukcije u odnosu na stanice A549 kod kojih je u tom periodu primjećeno nakupljanje HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu. Tako HAdV-D26 može izbjeći razgradnju i nastaviti put prema jezgri.

Zaključno, promatrano unutarstanično putovanje HAdV-D26 razlikuje se između analiziranih modela, odnosno ovisno o prisutnosti receptora integrina αvβ3 ili inhibiciji klatrinom-posredovane endocitoze HAdV-D26 ostaje dulje ili kraće u endosomima u

Ocjena rada u tijeku

usporedbi sa kontrolnim stanicama. Općenito, u stanicama A549 većina HAdV-D26 u ranoj fazi transdukcije lokalizirana je u ranom endosomu, dok je u kasnijim fazama uglavnom prisutna u kasnom endosomu/lizosomu. U stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 uočena je smanjena lokalizacija HAdV-D26 kako u ranom, tako i u kasnom endosomu. Osim toga, u stanicama A549-E6 virus slabije lokalizira u ranom endosomu, ali se u njemu zadržava duže nego u stanicama A549 te izlazi brže iz kasnog endosoma/lizosoma. Uz mehanizam ulaska virusa, uočene razlike u dinamici i količini virusa u pojedinim endosomalnim odijeljcima mogu utjecati na uspješnost transdukcije HAdV-D26.

Formiranje endosoma unutar kojih se nalaze endocitozom uneseni adenovirusi tek je početak procesa sazrijevanja endosoma. Ovisno o sadržaju endosoma, njihovo kretanje unutar stanice precizno je regulirano proteinima Rab. S obzirom na to da je prethodno utvrđeno kako HAdV-D26 putuje unutar ranih i kasnih endosoma/lizosoma cilj drugog dijela istraživanja unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 bio je razjasniti povezanost proteina Rab s unutarstaničnim putovanjem HAdV-D26 i uspješnosti transdukcije. Zbog toga je provedeno utišavanje Rab proteina povezanih s različitim fazama sazrijevanja endosoma: ranih (Rab5), prijelaznih/sazrijevajućih (Rab7, Rab9) i kasnih endosoma (Rab7, Rab9) nakon čega je analizirana kolokalizacija HAdV-D26 s markerima ranog (EEA1) ili kasnog endosoma (LAMP1) kako bi se dodatno razjasnila funkcionalna uloga endosoma u unutarstaničnom putovanju HAdV-D26.

U stanicama A549 s utišanim Rab5, 30 minuta nakon transdukcije zabilježeno je približno 10 % povećanje lokalizacije HAdV-D26 u ranim endosomima u usporedbi sa kontrolnim stanicama. Međutim, s vremenom je došlo do postupnog smanjenja količine virusa u ranim endosomima te se lokalizacija virusa vratila na razinu usporedivu s onom u kontrolnim stanicama. Povećana lokalizacija HAdV-D26 u ranim endosomima može se pripisati smanjenoj količini Rab5, ključnog regulatora sazrijevanja ranog endosoma. Naime, zbog smanjenje količine Rab5 moglo je doći do nakupljanja virusa u ranim endosomima zbog usporenog prijelaza u kasnije faze sazrijevanja endosoma. Iz literature je poznato da se tijekom sazrijevanja endosoma protein Rab5 postupno zamjenjuje proteinom Rab7 čime se određuje smjer transporta endosoma, održava homeostaza ranih endosoma, ali i aktiviraju signalni putevi odgovorni za formiranje novih, funkcionalnih ranih endosoma

Ocjena rada u tijeku

obilježenih Rab5 [143]. Budući da u stanicama A549 uslijed utišavanja Rab5 ne dolazi do njegove zamjene Rab7 proteinom, izostaje i formiranje novih funkcionalnih ranih endosoma, ali i prijelaza u kasnije faze sazrijevanja endosoma.

Regrutiranje efektora EEA1 na membranu endosoma zahtjeva interakciju s aktiviranim proteinom Rab5. Iako utišavanje Rab5 potencijalno sprječava vezanje EEA1 na membranu, u stanicama u kojima je utišan Rab5 uočena je kolokalizacija HAdV-D26 i markera EEA1. Dva su moguća objašnjenja. Prvo, činjenica da utišavanje Rab5 proteina nije apsolutno, stoga i dalje postoji manja količina Rab5 na kojeg se EEA1 može vezati ili, drugo, vezanje EEA1 za fosfatidilinozitol-3-fosfate (PI(3)P) u membranama. Naime, interakcija EEA1 s PI(3)P jednako je važna kao i interakcija EEA1 s Rab5 i nužna za sazrijevanje ranog endosoma [144]. Stoga je moguće da stanica uspijeva djelomično kompenzirati nedostatak Rab5 alternativnim mehanizmima, uključujući aktivnost PI3 kinaze i EEA1, što vremenom omogućuje nastavak sazrijevanja endosoma i transporta HAdV-D26, a što se u rezultatima može uočiti kao smanjena lokalizacije HAdV-D26 u ranim endosomima na razinu kontrolnih stanica nakon 120 minuta transdukcije.

Utišavanje proteina Rab7 u vrlo ranoj fazi infekcije (30 minuta) ne utječe na lokalizaciju HAdV-D26 u ranom endosomu. Međutim, tijekom preostalog vremena transdukcije (1 h i 30 min) smanjena količina Rab7 rezultirala je povećanom količinom HAdV-D26 u ranom endosomu, odnosno njegovim nakupljanjem. Ovakav rezultat odražava usporeni prijelaz u kasnije faze sazrijevanja endosoma zbog nedostatka Rab7 – regulatora prijelaza ranog endosoma u kasni endosom [145]. Slično tome, u slučaju utišavanja Rab9, u ranoj fazi transdukcije također nije uočena promjena u lokalizaciji HAdV-D26 u ranom endosomu. Ipak, tijekom preostalog vremena transdukcije smanjenje količine Rab9 dovodi do smanjene lokalizacije HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu. S obzirom na dinamiku putovanja HAdV-D26 u netretiranim stanicama A549, gdje je zabilježeno da se 120 minuta nakon transdukcije HAdV-D26 većinom zadržava u kasnim endosomima/lizosomima, ovi rezultati ukazuju da protein Rab9 ima ulogu u nakupljanju HAdV-D26 u kasnim endosomima/lizosomima.

Ocjena rada u tijeku

Promatranjem uspješnosti transdukcije nakon modulacije količine proteina Rab u stanicama A549 uočeno je da utišavanje proteina Rab9 pospješuje transdukciju, dok je utišavanje proteina Rab5 i Rab7 ne mijenja. Budući da je Rab9 povezan sa sazrijevanjem endosoma u kasni endosomom/lizosomom, ovi rezultati sugeriraju da je uspješna transdukcije koja se uočava u stanicama A549, a u kojima nije promijenjena količina proteina Rab, posljedica bijega HAdV-D26 iz ranog endosoma u ranoj fazi transdukcije. Dodatno, dinamika putovanja upućuje na to da HAdV-D26 koji ne uspije napustiti rani endosom ostaje zarobljen u kasnom endosomu/lizososmu iz kojeg ne izlazi te ne može uspješno transducirati stanicu. Na temelju ovih rezultata, zaključeno je da se modulacijom unutarstaničnog putovanja u kasnim endosomima/lizosomima, smanjenjem količine Rab9, djelomično može poboljšati transdukcija HAdV-D26. Zanimljivo, u stanicama A549-E6 utišavanje Rab9 nije pospješilo transdukciju. Ako se u obzir uzme činjenica da se ove dvije stanične linije razlikuju po količini integrina αvβ3 može se pretpostaviti da postoji poveznica između receptora, odnosno vrste endocitoze i uspješnosti transdukcije HAdV-D26.

Uspješna transdukcija adenovirusa posljedica je uspješnog unutarstaničnog putovanja, odnosno uspješne dostave DNA virusa u jezgru stanica. U skladu s time, kako bi se bolje razumijela uspješnost transdukcije HAdV-D26 u kontekstu rezultata unutarstaničnog putovanja, promatrana je dinamika dostave virusne DNA u jegru stanica A549. Validacija protokola provedena je analizom dinamike dostave DNA najistraženijeg adenovirusa, HAdV-C5. Prema literaturnim podacima, poznato je da HAdV-C5 vrlo brzo nakon ulaska u stanice napušta rani endosom te da se već sat vremena nakon transdukcije njegova DNA nalazi u jezgri stanica [28]. Ovakva opažanja primjećena su u rezultatima dobivenim ovim istraživanjem gdje je uočeno da je već sat vremena nakon transdukcije gotovo ukupna količina DNA HAdV-C5 u jezgri. Iako je i DNA HAdV-D26 detektirana sat vremena nakon transdukcije, sveukupno gledano, u jezgri stanice je manja količina nakupljene DNA HAdV-D26 nego DNA HAdV-C5. Ovi rezultati u skladu su s ranijim istraživanjem koje je pokazalo uspješniju transdukciju stanica A549 HAdV-C5 u odnosu na transdukciju HAdV-D26 [81].

U vremenskim intervalima od jednog i četiri sata nakon transdukcije detektirana je najveća količina DNA HAdV-D26. Uzimajući u obzir rezultate lokalizacije HAdV-D26, pri čemu je

Ocjena rada u tijeku

pokazano da približno 20 % HAdV-D26 uspjeva pobjeći iz endosoma dva sata nakon transdukcije dok se preostali HAdV-D26 zadržava u kasnom endosomu/lizosomu, kao i podatke koji ukazuju da se uspješnost transdukcije može dodatno povećati modulacijom putovanja virusa u kasnom endosomu/lizosomu, može se zaključiti da rana faza transdukcije i bijeg iz ranog endosoma predstavljaju ključne čimbenike za uspješnu transdukciju HAdV-D26 u stanicama A549. Takav zaključak dodatno podupiru i rezultati koji pokazuju da inhibicija zakiseljavanja kasnih endosoma/lizosoma dovodi do uspješnije transdukcije HAdV-D26. Drugim riječima, može se pretpostaviti da je učinkovita dostava virusne DNA u jezgru rezultat ranog bijega HAdV-D26 u citosol, koji je omogućen povoljnim pH uvjetima u ranim endosomima. U rezultatima je također primjećeno da je osam sati nakon transdukcije količina nakupljene DNA HAdV-D26 u jezgri manja nego nakon jednog ili četiri sata. Ova pojava može se objasniti razgradnjom virusne DNA uslijed aktivacije staničnih obrambenih mehanizama usmjerenih prema stranoj DNA [146] ili zasad nepoznatim mehanizmom izlaska virusne DNA iz jezgre stanice.

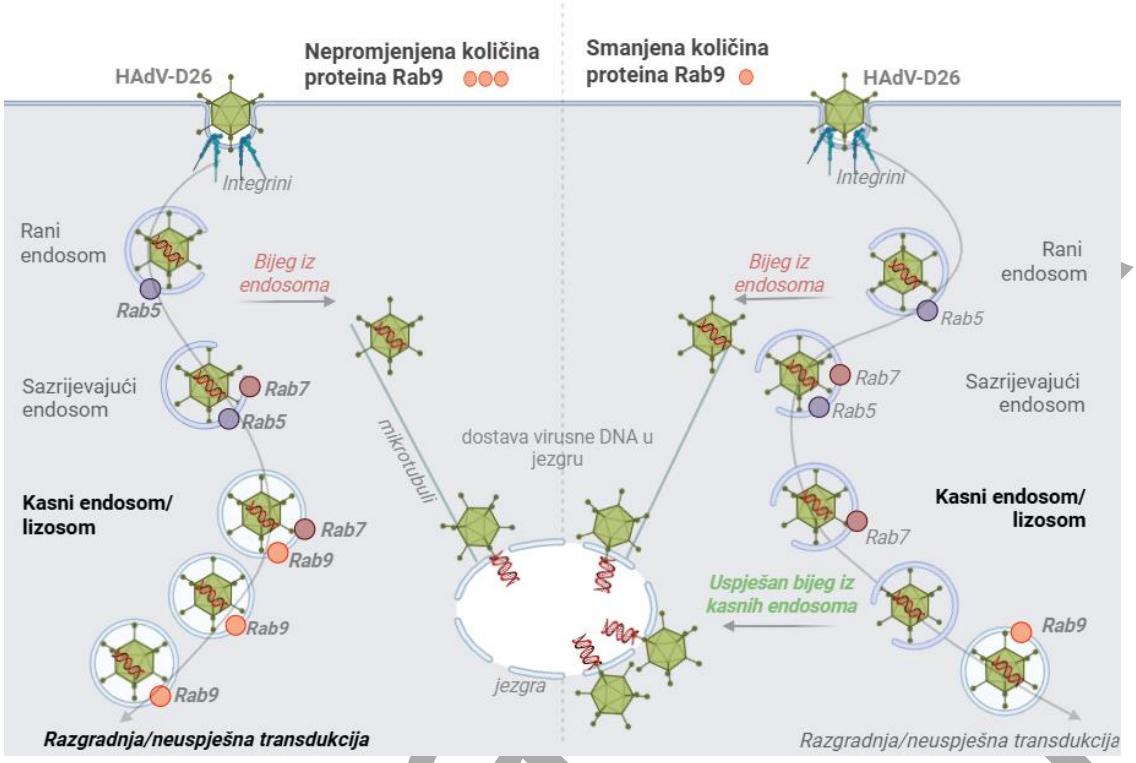
Dinamika dostave DNA u jezgru stanica A549 sa smanjenom količinom Rab9 pokazala se usporedivom sa kontrolnim stanicama, uz jednu iznimku. Naime, sat vremena nakon transdukcije, količina nakupljenje DNA virusa u jezgri stanice bila je povećana u stanicama sa smanjenom količinom Rab9. Promatranjem rezultata unutarstaničnog putovanja uočeno je da je sat vremena nakon transdukcije približno 45 % HAdV-D26 lokalizirano u kasnom endosomu/lizosomu. Smanjenjem količine Rab9 vjerojatno je zaustavljeno putovanje adenovirusa prema staničnim putevima razgradnje, čime je HAdV-D26 zadržan unutar endosoma čija se pH vrijednost nije mijenjala ili se mijenja sporije nego u kontrolnim stanicama, što je virusu omogućilo dulje vrijeme za bijeg iz endosoma i uspješnu dostavu DNA u jezgru stanice (slika 27). Iako uloga Rab9 proteina u unutarstaničnom putovanju i uspješnosti transdukcije adenovirusa dosad nije opisana u literaturi, postoje podaci o njegovoj ulozi kod drugih virusa. Tako je pokazano da utišavanje Rab9 inhibira replikaciju virusa ebole, ospica, virusa humane imunodeficijencije (HIV) i marburškog virusa, dok na replikaciju reovirusa – jedinog od ispitanih virusa bez ovojnice – utišavanje Rab9 nije imalo učinka [147]. Nadalje, istraživanja su pokazala da su internalizacija i transport humanog papiloma virusa (HPV) prema jezgri ovisni o proteinu Rab9a. Zanimljivo je da je povećana količina aktivnog, GTP-vezanog oblika Rab9a (GTP-

Ocjena rada u tijeku

Rab9a) smanjila internalizaciju i transport virusa, dok je povećana količina neaktivnog, GDP-vezanog oblika (GDP-Rab9a) pospješila ove procese [148]. U slučaju hepatitisa B također je uočeno da Rab9 ima ulogu u infekciji stanica. Naime, pokazano je da receptor povezan s autofagijom – NDP52 – tvori kompleks s Rab9 i sa proteinima virusne ovojnice čime se virus usmjerava prema lizosomalnoj razgradnji. Dodatno, Rab9 posreduje u induciranju razgradnje virusa hepatitisa B putem receptora NDP52 [149].

Na temelju dobivenih rezultata i dostupne literature, moguće je zaključiti da protein Rab9 u ranoj fazi djeluje kao negativni regulator transdukcije HAdV-D26. Naime, korištenjem baze podataka RCSB Protein Data Bank (engl. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank*; RCSB PDB) predviđeno je da vlakno HAdV-D26 strukturno može ostvariti interakciju s receptorom manoza-6-fosfatom (M6PR) (rezultati nisu prikazani). Za M6PR je poznato da ima ključnu ulogu u dostavi novonastalih lizosomalnih enzima iz trans-Golgijeve mreže u endosome. Poznato je i da se dio M6PR nalazi na membrane stanice gdje može vezati ligande koji se zatim usmjeravaju u lizosomalnu razgradnju [150]. Također, pokazano je da Rab9 ima važnu ulogu u recikliranju M6PR-a natrag u trans-Golgijevu mrežu [151]. Uzimajući u obzir moguću interakciju vlakna HAdV-D26 s M6PR-om, može se pretpostaviti da smanjena količina Rab9 u stanicama potencijalno sprječava usmjeravanje manjeg broja virusa u razgradnju tijekom rane faze transdukcije, što omogućuje većem broju virusa da izađu iz endosoma i izbjegnu razgradnju. To bi moglo objasniti rezultate koji ukazuju na povećanu količinu virusne DNA u jezgri unutar jednog sata nakon transdukcije HAdV-D26.

Ocjena rada u tijeku



Slika 27. Prijedlog modela načina na koji protein Rab9 regulira izlazak HAdV-D26 iz kasnih endosoma/lizosoma i utječe na uspješnost transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549. HAdV-D26 se nakon endocitoze u stanicama nalazi unutar endosoma na čijim se membranama, uslijed sazrijevanja, izmijenjuju proteini Rab. Tijekom rane faze transdukcije HAdV-D26 izlazi iz endosoma koji su Rab5 ili Rab7 pozitivni i uspješno dostavlja DNA u jezgru stanice. HAdV-D26 koji ne uspije pobjeći iz ranih endosoma zaostaje u Rab9 pozitivnom endosomu i ne uspjeva transducirati stanicu. Smanjenjem količine proteina Rab9, HAdVD-26 može pobjeći iz kasnih endosoma/lizosoma i uspješno transducirati stanicu.

Poznato je da imunosni sustav stanice domaćina može prepoznati komponente adenovirusa, poput kapside ili genetičkog materijala, tijekom svih faza infekcije virusom. Početna interakcija adenovirusa i receptora, osim što potiče signale uključene u proces endocitoze, može biti trenutak prepoznavanja patogena i početak stimulacije signalnih puteva uključenih u ekspresiju pro-upalnih citokina. Stoga je u ovoj doktorskoj disertaciji postavljena hipoteza da bi različito unutarstanično putovanje HAdV-D26 omogućilo izloženost virusa drugačijim staničnim senzorima i potaknulo drugačiji urođeni imunosni odgovor.

Stanice epitela i na svojoj površini i unutar stanice posjeduju različite stanične senzore urođenog imunosnog sustava kojima mogu prepoznati komponente virusa i tako brzo

Ocjena u tijeku

reagirati na infekciju [45]. S obzirom na to da je u ovom istraživanju pokazano različito unutarstanično putovanje HAdV-D26 u stanicama A549, A549-E6 te u stanicama A549 s inhibiranom klatrinom-posredovanom endocitozom uslijed tretmana Pitstopom 2, i da je utvrđeno da se u promatranim stanicama različit udio virusa tijekom različitih vremenskih intervala nalazi u endosomima različitog proteinskog sastava, pretpostavljeno je da bi razlike u unutarstaničnom putovanju HAdV-D26 mogle omogućiti vremenski i prostorno drugačiju izloženost virusa staničnim senzorima, a posljedično i različitu stimulaciju urođenog imunosnog odgovora. U drugom dijelu ove doktorske disertacije istražena je povezanost unutarstaničnog putovanja i aktivacije rane urođene imunosti te su istraženi proteini uključeni u prepoznavanje HAdV-D26 i prijenos signala putevima povezanim s aktivacijom urođene imunosti.

Kako bi se jasnije razumijela povezanost različitog unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 s potencijalno drugačijom aktivacijom urođene imunosti, odlučeno je praćenje promjene razine ekspresije *IL6* i *IL8* i količine izlučenih proteina IL6 i IL8 u stanicama A549, A549-E6 te u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2. Dodatno, uveden je i model stanica A549-E6 s inhibiranom klatrinom-posredovanom endocitozom uslijed tretmana Pitstopom 2. Četiri eksperimentalna modela omogućila su bolji uvid u poticanje urođenog imunosnog odgovora nakon transdukcije HAdV-D26 na sljedeći način: i) usporedbom stanica A549, A549 tretiranih Pitstopom 2 i A549-E6 istražen je utjecaj promijenjenog unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 na aktivaciju signalnih puteva urođene imunosti; ii) usporedbom stanica A549 i njihovog klona, stanica A549-E6 u kojima se očekuje snažniji imunosni odgovor zbog bolje transdukcije i veće količine HAdV-D26, a koja zbog slabije transdukcije u stanicama A549 potencijalno ne bi bila uočena, proučen je mehanizam aktivacije urođene imunosti nakon transdukcije HAdV-D26; iii) usporedbom transduciranih stanica A549 tretiranih Pitstopom 2 i A549-E6 tretiranih Pitstopom 2, pri čemu je u oba slučaja virus zaustavljen u blizini stanične membrane, a ključna razlika u ova dva uvjeta je količina integrina, ispitana je uloga integrina αvβ3 u aktivaciji signalnih puteva urođene imunosti.

Dobiveni rezultati su pokazali da stanice A549 nakon transdukcije HAdV-D26 pokazuju povećanu ekspresiju *IL6* i *IL8*. Literaturni podaci slično su pokazali i za neke druge adenoviruse. Tako je pokazano da infekcija adenovirusom tipa 14p1 iz grupe B povećava

Ocjena rada u tijeku

razinu ekspresije *IL6* u primarnim bronhijalnim epitelnim stanicama čovjeka, 48 sati nakon infekcije [152]. Dodatno, objavljeni su i rezultati koji pokazuju da infekcija stanica A549 adenovirusom tipa 7 povećava razinu ekspresiju *IL8* [153]. Zanimljivo, unatoč promjenjenoj transkripciji, u stanicama A549 nije zabilježeno povećano lučenje proteina IL6 ili IL8 nakon infekcije HAdV-D26. Također, nije uočena ni aktivacija MAP kinaza ERK i p38, kao ni transkripcijskih faktora NF-κB p65 i IRF3. Jedno od mogućih objašnjenja je u tome da HAdV-D26 slabije transducira stanice A549 zbog niske količine integrina αvβ3 na površini stanica. Posljedično, signalni putevi povezani s urođenim imunosnim odgovorom aktivirani su ispod granice detekcije.

Za detaljnije razumijevanje aktivacije urođene imunosti korišten je klon stanica A549, A549-E6, koji zbog povećane ekspresije integrina αvβ3 na površini stanice omogućuje učinkovitiju transdukciju HAdV-D26. U stanicama A549-E6 uočena je viša bazalna ekspresija *IL6* i *IL8* u usporedbi sa stanicama A549. S obzirom na to da stanice A549-E6 u usporedbi s roditeljskim stanicama A549 imaju povećanu ekspresiju integrina αvβ3, ovaj rezultat upućuje na uključenosti integrina αvβ3 u aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom *IL6* i *IL8*. Literatura također upućuje na to da integrin αvβ3 pojačava aktivaciju urođenog imunosnog odgovora posredovanog svim TLR-ovima prisutnima na površini stanice [154]. Suprotno tome, u B-limfocitima je pokazano da αv podjedinica integrina ima ulogu u održavanju homeostaze upalnog odgovora, s obzirom na to da B-limfociti s utišanom ekspresijom αv podjedinice pokazuju pojačanu reakciju na TLR-ligande. [155]. Nakon transdukcije HAdV-D26 ekspresija *IL8* je bila dodatno pojačna dok je ekspresija *IL6* ostala nepromijenjena. Unatoč tome, rezultati pokazuju da je ekspresija *IL6* nakon transdukcije djelomično ovisna o aktivnosti MK2, kinaze koja djeluje nizvodno od p38. Povišena bazalna ekspresija *IL6* u stanicama A549-E6 može objasniti zašto se nakon transdukcije HAdV-D26 ne uočava promjena u ekspresiji ovog gena. Naime, moguće je da je signalni put p38/MK2 već dovoljno aktivan u bazalnim uvjetima zbog čega stanica zaustavlja daljnju aktivaciju transkripcijskog odgovora na transdukciju HAdV-D26. U pozadini promijenjene ekspresije gena *IL8* primjećena je aktivacija p38 te NF-κB p65 dok kinaza ERK i transkripcijski faktor IRF3 nisu bili uključeni u urođeni imunosni odgovor izazvan transdukcijom HAdV-D26. Ove rezultati dodatno potvrđuju i istraživanja iz literature u kojima je pokazano da je povećana ekspresija *IL8* nakon transdukcije stanica

Ocjena rada u tijeku

rožnica adenovirusom iz grupe D (tip 19) posredovana aktivacijom MAP kinaze p38 i aktivacijom transkripcijskog faktora NF-κB p65 [156].

U stanicama A549 i A549-E6 koje su tretirane Pitstopom 2 uočena je veća razina ekspresije, ali i lučenje proteina IL6 i IL8 u odnosu na kontrolne stanice. Takav ishod može biti posljedica zaustavljanja virusa u blizini membrane stanice zbog čega je HAdV-D26 duže vrijeme dostupan staničnim senzorima te snažnije potiče aktivaciju urođenog imunosnog odgovora. U pozadini aktivacije staničnih obrambenih mehanizma, kada je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane stanica A549 i A549-E6, nalaze se kinaza p38 i transkripcijski faktor NF-κB p65. Dodatno, u stanicama A549-E6 uočena je i aktivacija transkripcijkog faktora IRF3.

Uključenost p38 kinaze u ovom kontekstu može se djelomično pripisati staničnom stresu uzrokovanom inhibicijom klatrinom-posredovane endocitoze. Pitstop 2, poznat kao inhibitor navedenog procesa, veže se na klatrin i time onemogućuje vezanje adaptornih proteina potrebnih za formiranje klatrinskih mjehurića. U literaturi je pokazano da Pitstop 2 može smanjiti ekspresiju Rab5, glavnog regulatora ranih endosoma [157] dok je u drugom istraživanju utvrđeno da p38α kinaza može izravno fosforilirati EEA1, ključnog efektora Rab5 proteina [158]. Na temelju toga može se zaključiti da inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze narušava funkciju endosomalnog sustava, što može djelovati kao stresni podražaj i dovesti do aktivacije signalnih puteva, uključujući p38. U ovoj doktorskoj disertaciji Pitstop 2 korišten je kao alat kako bi se HAdV-D26 zadržao u blizini membrane, čime se sprječava njegovo unutarstanično putovanje. Također, svi rezultati dobiveni u stanicama koje su tretirane Pitstopom 2 i transducirane HAdV-D26 su uspoređeni s odgovarajućim kontrolnim stanicama isključivo tretiranim Pitstopom 2 čime je omogućeno da se uočene promjene u aktivaciji urođene imunosti pripišu transdukciji HAdV-D26.

Aktivirana kinaza p38 prenosi signal nizvodno na brojne efektorske molekule, uključujući transkripcijske faktore, regulatore poput proteina uključenih u remodeliranje kromatina, te druge kinaze (MK2, MK3, MNK1/2, PAK6) [159]. U ovom je istraživanju pokazano da je MK2 djelomično odgovorna za ekspresiju *IL-6* u stanicama A549 i A549-E6, u kojima je HAdV-D26 zadržan u odjeljcima blizu membrane stanice. Prethodna istraživanja pokazala

Ocjena rada u tijeku

su da infekcija stanica adenovirusom tipa 2 potiče aktivaciju MAP kinaze p38 i njene nizvodne kinaze MK2, čime se omogućava efikasnije kretanje virusnih čestica duž mikrotubula prema jezgri stanice. Zanimljivo je da vrhunac aktivacije MK2 nastupio u trenutku kada se većina virusnih čestica nalazila u citosolu, ali još nisu ušle u jezgru [125]. U skladu s dobivenim rezultatima, uočena aktivacija p38 i uključenost MK2 u ekspresiju *IL-6* u obje stanične linije u kojima je HAdV-D26 zadržan blizu membrane može predstavljati pokušaj virusa da potakne vlastiti transport duž mikrotubula prema jezgri stanice.

Osim uključenosti p38, pokazano je i da je transkripcijski faktor NF-κB p65 - ključan za aktivaciju urođenog imunosnog odgovora, bio aktiviran u obje stanične linije u istim eksperimentalnim uvjetima. Zanimljivo je da su i p38 i transkripcijski faktor NF-κB aktivirani upravo u uvjetima kada je unutarstanično putovanje HAdV-D26 bilo zaustavljeno. S obzirom na to da je jedina razlika transduciranih stanica A549 i transduciranih stanica A549-E6, tretiranih Pitstopom 2, količina integrina αvβ3, može se zaključiti da su ovi integrini uključeni u aktivaciju signalnog puta MAP kinaze p38 te aktivaciju transkripcijskog faktora NF-κB p65. U literaturi su također dostupne informacije o povezanosti integrina αvβ3 s aktivacijom transkripcijskog faktora NF-κB, ali u stanicama endotela [160, 161]. Sumarno, može se zaključiti da je ekspresija *IL6* u obje stanične linije, uslijed zaustavljanja HAdV-D26, djelomično potaknuta aktivacijom p38 kinaze i njezine nizvodne efektorske kinaze MK2.

Aktivnost proteina MAPK signalnog puta, transkripcijskih faktora NF-κB p65 i IRF3 sugeriraju na uključenost TLR-ova u prepoznavanje HAdV-D26. Za TLR-ove je poznato da mogu biti lokalizirani na površini stanice, ali i u endosomima. Svi TLR-ovi, osim TLR3, signal prenose nizvodno vezanjem adaptora MyD88. TLR3 to čini vezanjem adaptora TICAM-1, a TLR4 signal može prenijeti vezanjem MyD88 ili TICAM-1 [162]. Budući da se TLR-ovi nalaze na površini stanice i unutar endosoma, mogu prepoznati adenovirus tijekom cijelog puta infekcije. Dosadašnja istraživanja pokazala su uključenost TLR2 i TLR9 u aktivaciju urođenog imunosnog odgovora u stanicama transduciranim vektorom temeljenim na adenovirusu tipa 5 [57]. Također, utvrđeno je da plazmacitoidne dendritičke stanice prepoznaju adenovirus tipa 5 putem TLR9 [163]. Budući da TLR9 prepoznaje dvolančanu molekulu DNA patogena kao signal za aktivaciju nizvodnih signalnih puteva, a da adenovirusi unutar

Ocjena rada u tijeku

kaspide sadrže upravo takvu molekulu DNA, početna hipoteza bila je da utišavanje TLR9 može utjecati na razinu ekspresije *IL6* i *IL8*. Međutim, utišavanje TLR9 u stanicama A549 nije dalo zadovoljavajuće rezultate. Stoga je pristup promijenjen i pozornost preusmjerena na utišavanje proteina adaptora koji se vežu na citoplazmatski dio TLR-a i koji su ključni za prijenos signala. Većina TLR-ova koristi adaptor MyD88, dok TLR3 signale prenosi putem adaptora TICAM-1, a TLR4 može koristiti oba adaptora, ovisno o kontekstu. Kako bi se identificirao koji TLR je uključen u prepoznavanje virusa, napravljeno je utišavanje proteina MyD88 i TICAM-1 te je promatrana promjena ekspresije *IL6* i *IL8.*

Zanimljiv rezultat u transduciranim stanicama A549 uočen je nakon utišavanja MyD88. Naime, iako bi se moglo pretpostaviti da će utišavanje glavnog adaptora većine TLR-ova zaustaviti nizvodni prijenos signala prepoznavanja HAdV-D26, uočeno je povećanje ekspresije *IL6* i *IL8*. Razlog tome može biti činjenica da adaptori TLR-ova nisu isključivo pozitivni regulatori signalnih puteva, već je pokazano da imaju ulogu i u negativnoj regulaciji s ciljem sprječavanja pretjerane aktivacije upalnog odgovora. Primjerice, poznato je da IRF3-om potaknuta razgradnja adaptora TICAM-1 važna za negativnu regulaciju urođenog imunosnog odgovora posredovanog transkripcijskim faktorom NF-κB [164]. Također, pokazano je da je molekula TRAF6 (engl. *TNF receptor-associated factor 6*; TRAF6), koja se veže na adaptore MyD88 i TICAM-1 u nešto kasnijim fazama prijenosa signala, uključena u negativnu regulaciju aktivacije transkripcijskog faktora NF-κB i stimulaciju urođenog imunosnog odgovora [165].

U skladu s time, moguće je zaključiti da je utišavanje MyD88 poremetilo ravnotežu upalnog odgovora i zaustavilo negativnu regulaciju signalnih puteva što se očituje povećanom ekspresijom oba gena. Tome u prilog ide i rezultat povećane ekspresije oba gena nakon tretmana stanica A549 inhibitorom TLR4 (TAK-242). Naime, ovaj inhibitor omogućuje vezanje liganda na TLR4, ali zaustavlja nizvodni prijenos signala posredovan MyD88 i TICAM-1 što dodatno sugerira na ulogu adaptora u negativnoj regulaciji aktivacije upalnog odgovora.

Dva TLR-a mogu regrutirati adaptor TICAM-1 za prijenos signala nizvodno, TLR3 i TLR4. Dobiveni rezultati su pokazali da je u stanicama A549 transduciranim HAdV-D26 ekspresija

Ocjena rada u tijeku

IL8 djelomično ovisna o adaptoru TICAM-1. Zanimljivo, iako je uočeno smanjenje ekspresije *IL8,* količina izlučenog IL8 je porasla. Takav rezultat potencijalno može biti posljedica aktivacije alternativnih signalnih puteva koji i dalje potiču translaciju i lučenje IL8 unatoč smanjenju transkripcije s ciljem održavanja homeostaze ekspresije *IL8* ili zbog svojstva IL8 da autokrino regulira transkripciju [166]. Rezultati dobiveni nakon utišavanja TICAM-1 sugeriraju na uključenost TLR3 ili TLR4 u prepoznavanju HAdV-D26 i aktivaciji signalnih puteva urođene imunosti povezanih s ekspresijom *IL8.*

Budući da je pokazano da inhibicija TLR4 u transduciranim stanicama A549 povećava ekspresiju *IL8*, zaključeno je da TLR4 nije uključen u prepoznavanje HAdV-D26 i aktivaciju signalnih puteva povezanih s ekspresijom *IL8.* Korištenjem specifičnog inhibitora TLR3 ili metodom utišavanja TLR3 potrebno je dodatno validirati rezultate i potvrditi uključenost TLR3 u prepoznavanju HAdV-D26.

U transduciranim stanicama A549-E6 pokazano je da ekspresija *IL8* djelomično ovisna o MyD88 što sugerira na moguću uključenost brojnih TLR-ova u prepoznavanje HAdV-D26, osim TLR3. Dodatno, rezultati koji pokazuju da je ekspresija *IL8* nepromijenjena nakon tretmana inhibitorom TAK-242, ukazuju da ni TLR4, koji može vezati adaptor MyD88 nije uključen u prepoznavanje HAdV-D26 u stanicama A549-E6. Budući da u stanicama A549-E6 HAdV-D26 osim na površini stanice može biti prepoznat i unutar endosoma u kojima putuje, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se jednoznačno moglo reći o kojem TLR-u se radi. Vrlo zanimljivo je da iako utišavanje TICAM-1 nije utjecalo na razinu ekspresije *IL8* nakon transdukcije HAdV-D26, lučenje IL8 je bilo smanjeno. Takav rezultat može upućivati na ulogu TICAM-1 u posttranskripcijskim fazama, primjerice u regulaciji translacije proteina. U prilog toj mogućnosti idu i podaci iz literature koji pokazuju da TICAM-1 potiče translaciju mRNA za *TNF-α,* pri čemu ne utječe na transkripcijsku aktivnost gena TNF-α, kao ni na nastabilnost njegove mRNA [167]. Potrebno je istaknuti da ekspresija *IL6* u stanicama A549-E6 nije ovisna o TLR-ovima što se jasno uočava nepromijenjenom ekspresijom nakon utišavanja adaptora MyD88 ili TICAM-1 te nakon inhibicije TLR4. Ovi rezultati samo su dodatna potvrda da nakon transdukcije HAdV-D26 u stanicama A549-E6 kao što je i ranije uočeno, ne dolazi do promjene u ekspresiji *IL6*.

Ocjena rada u tijeku

Kod stanica A549 i A549-E6 kod kojih je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane stanice pokazana je ovisnost eskpresije gena *IL6* i *IL8* o adaptoru TICAM-1. Dodatno, u stanicama A549-E6 pokazano je da utišavanje TICAM-1 uzorkuje i smanjeno lučenje IL8. Zbog toga što su ovi rezultati sugerirali na uključenost TLR3 ili TLR4 receptora u prepoznavanju HAdVD-26, napravljena je inhibicija TLR4, ali kako tijekom tretmana inhibitorom nije uočena promjena na razini ekspresije oba gena, zaključeno je da TLR4 nije uključen u prepoznavanje HAdV-D26 već da se vjerojatno radi o uključenosti TLR3, što je potrebno pokazati dodatnim eksperimentima.

Iako se aktivacija TLR3 obično potvrđuje prisutnošću aktivnog transkripcijskog faktora IRF3, koji je u ovom istraživanju detektiran isključivo u stanicama A549-E6 nakon zaustavljanja HAdV-D26 u blizini stanične membrane, aktivacija TLR3 može se također očitovati i putem transkripcijskog faktora NF-κB [162]. Aktivacija transkripcijskog faktora NF-κB zabilježena je pri zadržavanju virusa u blizini membrane stanica A549 i A549-E6 što može biti dodatni signal o potencijalnoj uključenosti TLR3 u prepoznavanje HAdV-D26 [168].

Ako se u obzir uzme da je povećana ekspresija *IL6* i *IL8* djelomično posredovana prijenosom signala nizvodno od TICAM-1 u obje stanične linije u kojima je HAdV-D26 zaustavljen ispod membrane stanice, a koje se razlikuju po količini integrina αvβ3, te uzimajući u obzir da je ekspresija gena *IL6* i *IL8* snažnije izražena u transduciranim stanicama A549-E6 tretiranim Pitstopom 2 nego u stanicama A549 tretiranim Pitstopom 2 (neprikazane apsolutne vrijednosti), može se zaključiti da integrin αvβ3 doprinosi snažnijoj aktivaciju urođenog imunosnog odgovora. Saznanja o tome dostupna su u literaturi koja ukazuje na *crosstalk* integrina i TLR-a koji može imati sinergistički učinak prilikom aktivacije urođenog imunosnog odgovora [169]. Tako je pokazano da istovremena interakcija herpes simpleks virusa (HSV) s integrinom αvβ3 i TLR2 pojačava aktivaciju transkripcijskog faktora NF-κB, što je pripisano olakšanim regrutiranjem adaptora MyD88 na TLR2 posredovanjem integrina [154]. Dodatno, i tijekom bakterijske infekcije u peritonealnim makrofagima uočena je pozitivna regulacija TLR4-posredovane signalizacije putem integrina αvβ3 [170].

Zaključno, pokazano je da promijenjeno unutarstanično putovanje HAdV-D26 rezultira različitom aktivacijom urođenog imunosnog odgovora, što se očituje u promijenjenoj razini ekspresije i lučenju upalnih citokina. Također je utvrđeno da produljeno vrijeme izloženosti

Ocjena rada u tijeku

HAdV-D26 staničnim senzorima, zbog zaustavljanja virusa u blizini membrane stanice, može doprinijeti snažnijem imunosnom odgovoru stanica.

Na temelju dobivenih rezultata promjenjene razine transkripcije isključena je uključenost TLR4, a pretpostavljena je uključenost TLR3 u prepoznavanju HAdV-D26 u obje stanične linije u uvjetu kad je virus zaustavljen u blizini membrane stanice. Budući da je poznato da TLR3 prepoznaje svoj ligand unutar endosoma, a da do sada nije okarakteriziran odijeljak u kojem se HAdV-D26 zadržava u blizini membrane predlažu se dva moguća objašnjenja njegove aktivacije u navedenim modelima:

i) inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze nije apsolutna kako je već opisano u literaturi koja ukazuje na nespecifičnost inhibitora te mogućnost da mali udio virusa uđe u endosome alternativnim putem, neovisnim o klatrinu [138], a unutar kojih TLR3 može prepoznati HAdV-D26.

ii) iako je TLR3 primarno lokaliziran u endosomima, novija istraživanja pokazuju da se u stanicama A549 TLR3 može nalaziti i na površini stanice, gdje također može potaknuti aktivaciju urođenog imunosnog odgovora izvan endosoma [59, 171, 172].

Postavlja se i pitanje kako TLR3, koji prepoznaje dvolančane RNA molekule (dsRNA) može prepoznati HAdV-D26, koji kao genetski materijal sadrži dvolančanu DNA zaštićenu proteinskom kapsidom. Jedna od mogućnosti je da tijekom proizvodnje adenovirusa dolazi do stvaranja veće količine virusnih RNA molekula koje se ne uspijevaju spakirati u virusne čestice, ne prevode se u proteine, te se vežu na proteine kapside. Ove RNA molekule potencijalno mogu formirati dvolančane strukture i biti prepoznate od strane TLR3 prilikom interakcije virusa sa staničnom površinom. Takva aktivacija urođenog imunosnog odgovora mogla bi stoga biti posljedica biološke kontaminacije virusne pripreme [173]. Ipak, treba naglasiti da postoje istraživanja koja opisuju kako adenovirusi tijekom replikacije koriste različite mehanizme za eliminaciju viška nekodirajuće molekule RNA kako bi izbjegli aktivaciju imunosnog odgovora domaćina [174]. Na temelju znanja o drugim virusima, primjerice o RSV-u (engl. *Respiratory syncytial virus*) dsRNA se može promatrati kao alat kojim se virus služi kako bi stanicu učinio više osjetljivom. Zašto to virus čini nije u potpunosti jasno, ali pretpostavlja se da promjena ravnoteže upalnog odgovora i homeostaze stanice tijekom različitih faza infekcije može biti korisna virusu [172].

Ocjena rada u tijeku

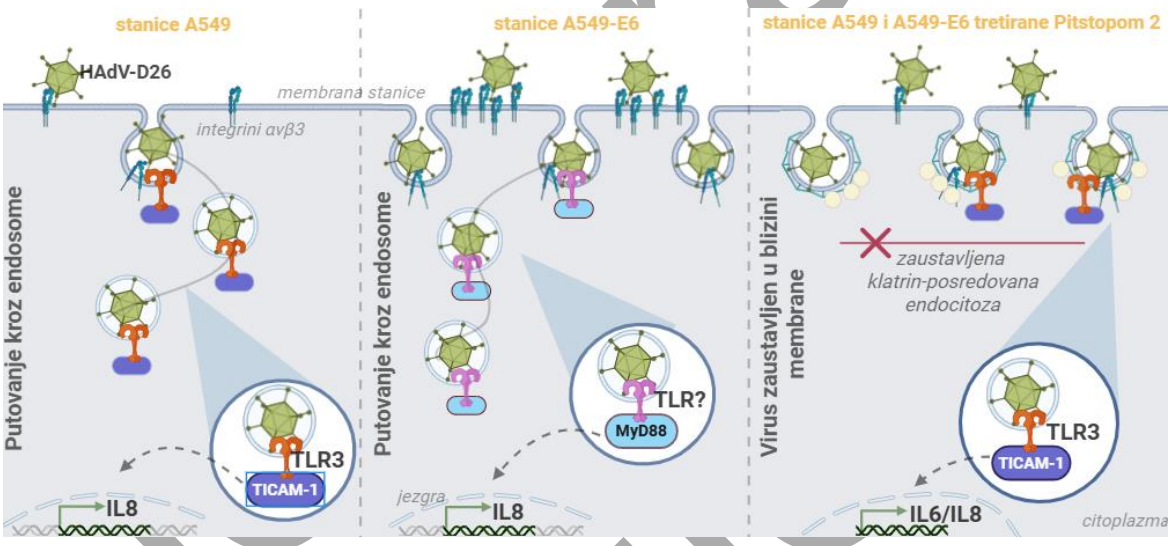
Dodatno, uzimajući u obzir rezultate količine izlučenih proteina dobivene metodom ELISA, kod koje je HAdVD-26 tijekom sat vremena transdukcije bio zadržan u blizini membrane stanice, ali je određeno vrijeme tijekom preostalih 48 sati virus neometano putovao u endosomima unutar stanice, može se pretpostaviti da je HAdV-D26 u stanicama A549-E6 - kod kojih je uočeno smanjeno lučenje IL8, prepoznat unutar endosoma u kasnijoj fazi transdukcije. Budući da je u tom eksperimentu napravljeno utišavanje adaptora TICAM-1 koji može posredovati signalizaciju TLR3 ili TLR4, postavlja se pitanje koji od ovih TLR-ova je uključen u prepoznavanje HAdV-D26 unutar endosoma.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da promjena unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 može izazvati drugačiji imunosni odgovor stanice, te po prvi put prema dostupnoj literaturi povezuju unutarstanično putovanje HAdV-D26 s aktivacijom urođenog imunosnog odgovora u epitelnim stanicama čovjeka. Do sada je u literaturi pokazano da TLR4 može prepoznati HAdV-D26 u fagocitima čovjeka, ali tek kao posljedicu vezanja α-defenzina ili laktoferina na kapsidu adenovirusa pri čemu je uočena aktivacija citosolnog senzora patogena - proteina NLRP3 i pojačano lučenje upalnih citokina [175, 176], međutim nema dostupnih istraživanja o TLR-ima uključenim u prepoznavanje HAdV-D26 u stanicama epitela čovjeka.

Na temelju rezultata dobivenih u ovoj doktorskoj disertaciji, pretpostavlja se da je TLR3 ključni stanični senzor za prepoznavanje HAdV-D26 u stanicama epitela čovjeka kada je virus zaustavljen u blizini membrane stanice te za aktivaciju signalnih puteva urođene imunosti što će u budućim istraživanjima biti potrebno i dodatno potvrditi. Također, u stanicama A549 kada virus neometano putuje, pretpostavlja se uključenost TLR3 u aktivaciju signalnih puteva urođene imunosti, dok je za stanice A549-E6 pokazano da i neki drugi TLR može sudjelovati u prepoznavanju HAdV-D26 (slika 28). Takav rezultat u stanicama A549-E6 nije neočekivan, budući da je u literaturi ranije utvrđeno da adenoviruse mogu prepoznati TLR2 i TLR9 [55, 57]. Međutim, zanimljivo je da u tom slučaju sama infekcija adenovirusom nije bila dovoljna za aktivaciju TLR9, već je njegova aktivacija ovisila i o specifičnom putu ulaska virusa posredovanom receptorima.

Ocjena rada u tijeku

Budući da je u transduciranim stanicama A549 pretpostavljena uključenost TLR3 u aktivaciji signalnih puteva povezanih s regulacijom ekspresije *IL8*, ali ne i *IL6* za koji je ranije uočena povećana ekspresija, ali i da se slično može uočiti kod stanica A549-E6 kod kojih se TLR-posredovana aktivacija signalnih puteva uočava kod ekspresije *IL8*, ali ne i kod *IL6*, postavlja se pitanje moguće uloge integrina αvβ3 u TLR-posredovanom prijenosu signala. Shodno tome, otvara se prostor za nova istraživanja koja bi mogla detaljnije razjasniti međudjelovanje integrina i TLR-ova, osobito u kontekstu prepoznavanja virusa i aktivacije imunosnog odgovora.



Slika 28. Predložen mehanizam prepoznavanja HAdV-D26 u stanicama A549, A549-E6 te u obje stanične linije nakon tretmana Pitstopom 2 uključuje TLR-ove. U stanicama A549 HAdV-D26 može biti prepoznat tijekom ulaska u stanicu ili tijekom putovanja unutar endosoma putem staničnog senzora TLR3 koji signal prenosi nizvodno regrutacijom adaptora TICAM-1 i aktivira puteve uključene u ekspresiju *IL8*. U stanicama A549-E6, bogatim integrinom αvβ3, HAdV-D26 također može biti prepoznat tijekom ulaska u stanicu ili putovanja unutar endosoma, ali ga prepoznaje još ne definiran tip TLR-a za koji je pokazano da regrutira adaptor MyD88 i aktivira puteve uključene u ekspresiju *IL8*. U stanicama A549 i A549-E6 kojima je inhibirana klatrinom-posredovana endocitoza i HAdV-D26 je zaustavljen u blizini membrane stanice, virus prepoznaje TLR3 i regrutacijom adaptora TICAM-1 aktivira puteve uključene u ekspresiju *IL6* i *IL8*.

Ocjenski rad

6. Zaključci

Ocjena rada u tijeku

1. U stanicama A549, A549 tretiranim inhibitorom klatrinom-posredovane endocitoze (Pitstopom 2) te u stanicama A549-E6 uočeno je različito unutarstanično putovanje HAdV-D26. Inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze, kao i povećana količina integrina αvβ3, uzrokovali su sporije oslobađanje HAdV-D26 iz ranog endosoma i uspješniji bijeg iz kasnih endosoma/lizosoma.
2. Rab5 uključen je u maturaciju ranih endosoma i njegova smanjena količina dovodi do zadržavanja HAdV-D26 u ranom endosomu. Rab7 je uključen u oslobađanje HAdV-D26 iz ranog endosoma, dok Rab9 sudjeluje u zadržavanju HAdV-D26 u kasnom endosomu/lizosomu, pri čemu njegova smanjena količina omogućuje učinkovitiji bijeg virusa iz kasnog endosoma/lizosoma.
3. Smanjena količina proteina Rab9 uzrokuje uspješniju transdukciju HAdV-D26 u stanicama A549 što se očituje i povećanom dostavom virusne DNA u jezgru stanica. Smanjena količina Rab7 pospješuje transdukciju HAdV-D26 u stanicama A549-E6.
4. Zaustavljanje zakiseljavanja lizosoma povećava uspješnost transdukcije HAdV-D26, a kotransdukcija HAdV-D26 i HAdV-C5 nema značajan utjecaj na uspješnost transdukciije HAdV-D26 što daje naslutiti da HAdV-D26 za ulazak u stanicu koristi različite endosome od HAdV-C5.
5. Zaustavljanje HAdV-D26 u blizini membrane stanica A549 i A549-E6 potiče snažniju ekspresiju i lučenje IL6 i IL8.
6. Aktivacija transkripcijskog faktora NF-κB p65 i MAP kinaze p38 u stanicama A549 i A549-E6 kod kojih je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane stanice potiče ekspresiju *IL6*. Aktivacija transkripcijskog faktora IRF3 i MAP kinaze p38 u stanicama A549-E6 transduciranim HAdV-D26 također potiče ekspresiju *IL6*.
7. U stanicama A549 transduciranim HAdV-D26 ekspresija *IL8* djelomično je posredovana prijenosom signala nizvodno od adaptora TICAM-1 dok je u stanicama A549-E6 transduciranim HAdV-D26 ekspresija *IL8* djelomično posredovana prijenosom signala nizvodno od adaptora MyD88.
8. U stanicama A549 i A549-E6 u kojima je HAdV-D26 zaustavljen u blizini membrane, ekspresija *IL6* i *IL8* djelomično je posredovana prijenosom signala nizvodno od adaptora TICAM-1, ali ne ovisi o TLR4 što sugerira uključenost TLR3.

Ocjena rada u tijeku

7. Literatura

Ocjena rada u tijeku

1. Gallardo, J., et al., Adenovirus Structure: What Is New? International Journal of Molecular Sciences, 2021. 22(10): p. 5240.

2. Benkő, M., et al., ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae 2022. J Gen Virol, 2022. 103(3).

3. Voss, J.D., R.L. Atkinson, and N.V. Dhurandhar, Role of adenoviruses in obesity. Reviews in Medical Virology, 2015. 25(6): p. 379-387.

4. Waye, M.M.Y. and C.W. Sing, Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. Pharmaceuticals, 2010. 3(10): p. 3343-3354.

5. Russell, W.C., Adenoviruses: update on structure and function. Journal of General Virology, 2009. 90(1): p. 1-20.

6. Liu, H., et al., Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. Science, 2010. 329(5995): p. 1038-43.

7. Charman, M., C. Herrmann, and M.D. Weitzman, Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication. FEBS Letters, 2019. 593(24): p. 3531-3550.

8. Pei, Z., et al., Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. Scientific Reports, 2013. 3(1): p. 3575.

9. Scarsella, L., et al., Advances of Recombinant Adenoviral Vectors in Preclinical and Clinical Applications. Viruses, 2024. 16(3): p. 377.

10. Yu, X., et al., Cryo-EM structure of human adenovirus D26 reveals the conservation of structural organization among human adenoviruses. Sci Adv, 2017. 3(5): p. e1602670.

11. Nicklin, S.A., et al., The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. Molecular Therapy, 2005. 12(3): p. 384-393.

12. Rafie, K., et al., The structure of enteric human adenovirus 41-A leading cause of diarrhea in children. Sci Adv, 2021. 7(2).

Ocjena rada u tijeku

13. Bergelson, J.M., et al., Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science, 1997. 275(5304): p. 1320-3.

14. Kirby, I., et al., Adenovirus type 9 fiber knob binds to the coxsackie B virus-adenovirus receptor (CAR) with lower affinity than fiber knobs of other CAR-binding adenovirus serotypes. J Virol, 2001. 75(15): p. 7210-4.

15. Roelvink, P.W., et al., The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. J Virol, 1998. 72(10): p. 7909-15.

16. Loustalot, F., E.J. Kremer, and S. Salinas, Membrane Dynamics and Signaling of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor. Int Rev Cell Mol Biol, 2016. 322: p. 331-62.

17. Wickham, T.J., et al., Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell, 1993. 73(2): p. 309-19.

18. Campbell, I.D. and M.J. Humphries, Integrin structure, activation, and interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(3).

19. Li, E., et al., Adenovirus Endocytosis via α_vIntegrins Requires Phosphoinositide-3-OH Kinase. Journal of Virology, 1998. 72(3): p. 2055-2061.

20. Arnberg, N., Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. Trends Pharmacol Sci, 2012. 33(8): p. 442-8.

21. Marttila, M., et al., CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. J Virol, 2005. 79(22): p. 14429-36.

22. Wang, H., et al., Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. Nat Med, 2011. 17(1): p. 96-104.

23. Andersson, E.K., Y.F. Mei, and G. Wadell, Adenovirus interactions with CD46 on transgenic mouse erythrocytes. Virology, 2010. 402(1): p. 20-5.

24. Burmeister, W.P., et al., Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. J Virol, 2004. 78(14): p. 7727-36.

Ocjena rada u tijeku

25. Short, J.J., et al., Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. Virus Res, 2006. 122(1-2): p. 144-53.

26. Smith, T.A., et al., Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. Hum Gene Ther, 2003. 14(8): p. 777-87.

27. Bru, T., S. Salinas, and E.J. Kremer, An update on canine adenovirus type 2 and its vectors. Viruses, 2010. 2(9): p. 2134-2153.

28. Miyazawa, N., R.G. Crystal, and P.L. Leopold, Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. J Virol, 2001. 75(3): p. 1387-400.

29. Gastaldelli, M., et al., Infectious adenovirus type 2 transport through early but not late endosomes. Traffic, 2008. 9(12): p. 2265-78.

30. Leung, T.K. and M. Brown, Block in entry of enteric adenovirus type 41 in HEK293 cells. Virus Res, 2011. 156(1-2): p. 54-63.

31. Lee, J.S., et al., Entry of Epidemic Keratoconjunctivitis-Associated Human Adenovirus Type 37 in Human Corneal Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020. 61(10): p. 50.

32. Leopold, P.L., et al., Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. Hum Gene Ther, 2000. 11(1): p. 151-65.

33. Greber, U.F., et al., Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. Cell, 1993. 75(3): p. 477-86.

34. Greber, U.F. and J.W. Flatt, Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. Annu Rev Virol, 2019. 6(1): p. 177-197.

35. Suomalainen, M., et al., A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells. J Virol, 2013. 87(22): p. 12367-79.

36. Wiethoff, C.M., et al., Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. J Virol, 2005. 79(4): p. 1992-2000.

Ocjena rada u tijeku

37. Burckhardt, C.J., et al., Drifting motions of the adenovirus receptor CAR and immobile integrins initiate virus uncoating and membrane lytic protein exposure. Cell Host Microbe, 2011. 10(2): p. 105-17.

38. Martinez, R., et al., The Amphipathic Helix of Adenovirus Capsid Protein VI Contributes to Penton Release and Postentry Sorting. Journal of Virology, 2015. 89(4): p. 2121-2135.

39. Scherer, J., J. Yi, and R.B. Vallee, PKA-dependent dynein switching from lysosomes to adenovirus: a novel form of host-virus competition. J Cell Biol, 2014. 205(2): p. 163-77.

40. Bailey, C.J., R.G. Crystal, and P.L. Leopold, Association of adenovirus with the microtubule organizing center. J Virol, 2003. 77(24): p. 13275-87.

41. Strunze, S., et al., Kinesin-1-Mediated Capsid Disassembly and Disruption of the Nuclear Pore Complex Promote Virus Infection. Cell Host & Microbe, 2011. 10(3): p. 210-223.

42. Wodrich, H., et al., Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways. J Virol, 2006. 80(19): p. 9608-18.

43. Lee, T.W.R., G.E. Blair, and D.A. Matthews, Adenovirus core protein VII contains distinct sequences that mediate targeting to the nucleus and nucleolus, and colocalization with human chromosomes. Journal of General Virology, 2003. 84(12): p. 3423-3428.

44. Gonçalves, M.A. and A.A. de Vries, Adenovirus: from foe to friend. Rev Med Virol, 2006. 16(3): p. 167-86.

45. Hendrickx, R., et al., Innate immunity to adenovirus. Hum Gene Ther, 2014. 25(4): p. 265-84.

46. Chintakuntlawar, A.V., et al., Viral capsid is a pathogen-associated molecular pattern in adenovirus keratitis. PLoS Pathog, 2010. 6(4): p. e1000841.

47. Appledorn, D.M., et al., TRIF, and TRIF-interacting TLRs differentially modulate several adenovirus vector-induced immune responses. J Innate Immun, 2009. 1(4): p. 376-88.

Ocjena rada u tijeku

48. Hartman, Z.C., E.P. Black, and A. Amalfitano, Adenoviral infection induces a multi-faceted innate cellular immune response that is mediated by the toll-like receptor pathway in A549 cells. Virology, 2007. 358(2): p. 357-72.

49. Melchjorsen, J., Learning from the Messengers: Innate Sensing of Viruses and Cytokine Regulation of Immunity — Clues for Treatments and Vaccines. Viruses, 2013. 5(2): p. 470-527.

50. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, Pathogen recognition by the innate immune system. Int Rev Immunol, 2011. 30(1): p. 16-34.

51. Yesudhas, D., et al., Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. Front Immunol, 2014. 5: p. 334.

52. Hung, W.-S., et al., Disabled-2 is a negative immune regulator of lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4 internalization and signaling. Scientific Reports, 2016. 6(1): p. 35343.

53. Troutman, T.D., J.F. Bazan, and C. Pasare, Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. Cell Cycle, 2012. 11(19): p. 3559-67.

54. Sartorius, R., et al., Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines. npj Vaccines, 2021. 6(1): p. 127.

55. Iacobelli-Martinez, M. and G.R. Nemerow, Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses. J Virol, 2007. 81(3): p. 1305-12.

56. Yamaguchi, T., et al., Role of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by serotype 5 adenoviral vectors. Hum Gene Ther, 2007. 18(8): p. 753-62.

57. Appledorn, D.M., et al., 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, 2008. 181(3): p. 2134-44.

58. Kondo, T., T. Kawai, and S. Akira, Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. Trends in Immunology, 2012. 33(9): p. 449-458.

Ocjena rada u tijeku

59. El-Zayat, S.R., H. Sibaii, and F.A. Mannaa, Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. Bulletin of the National Research Centre, 2019. 43(1): p. 187.

60. Fitzgerald, K.A., et al., LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. J Exp Med, 2003. 198(7): p. 1043-55.

61. Singh, H., J. Koury, and M. Kaul, Innate Immune Sensing of Viruses and Its Consequences for the Central Nervous System. Viruses, 2021. 13(2).

62. Tibbles, L.A., et al., Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the C-X-C chemokine IP-10. J Virol, 2002. 76(4): p. 1559-68.

63. Cargnello, M. and P.P. Roux, Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. 75(1): p. 50-83.

64. Qi, L., et al., Adenovirus 7 Induces Interlukin-6 Expression in Human Airway Epithelial Cells via p38/NF-κB Signaling Pathway. Frontiers in Immunology, 2020. 11.

65. Minamitani, T., D. Iwakiri, and K. Takada, Adenovirus virus-associated RNAs induce type I interferon expression through a RIG-I-mediated pathway. J Virol, 2011. 85(8): p. 4035-40.

66. Moynagh, P.N., The NF-kappaB pathway. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 20): p. 4589-92.

67. Nestić, D., et al., Human Adenovirus Type 26 Induced IL-6 Gene Expression in an αvβ3 Integrin- and NF-κB-Dependent Manner. Viruses, 2022. 14(4): p. 672.

68. Sun, S.-C., The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. Nature Reviews Immunology, 2017. 17(9): p. 545-558.

69. Wang, L., et al., The multiple roles of interferon regulatory factor family in health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024. 9(1): p. 282.

70. Berk, A.J. and P.A. Sharp, Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. Cell, 1978. 14(3): p. 695-711.

Ocjena rada u tijeku

71. Cepko, C.L. and P.A. Sharp, Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a nonvirion protein. Cell, 1982. 31(2 Pt 1): p. 407-15.

72. Majhen, D., et al., Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field. Hum Gene Ther, 2014. 25(4): p. 301-17.

73. Wu, V., et al., 145 Oncolytic Adenoviral Infection of Chordoma Achieves Treatment Efficacy Through Immunogenic Cell Death and Tumor Microenvironment Alteration. Neurosurgery, 2025. 71(Supplement_1): p. 31.

74. Badder, L.M., et al., The αvβ6 integrin specific virotherapy, Ad5NULL-A20.FCU1, selectively delivers potent "in-tumour" chemotherapy to pancreatic ductal adenocarcinoma. British Journal of Cancer, 2024. 131(10): p. 1694-1706.

75. Chavda, V.P., et al., Adenoviral Vector-Based Vaccine Platform for COVID-19: Current Status. Vaccines (Basel), 2023. 11(2).

76. Wallace, R., C.M. Bliss, and A.L. Parker, The Immune System—A Double-Edged Sword for Adenovirus-Based Therapies. Viruses, 2024. 16(6): p. 973.

77. Abbink, P., et al., Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. J Virol, 2007. 81(9): p. 4654-63.

78. Li, H., et al., Adenovirus serotype 26 utilizes CD46 as a primary cellular receptor and only transiently activates T lymphocytes following vaccination of rhesus monkeys. J Virol, 2012. 86(19): p. 10862-5.

79. Chen, H., et al., Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae. J Virol, 2010. 84(20): p. 10522-32.

80. Baker, A.T., et al., Human adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cell entry receptor. Sci Adv, 2019. 5(9): p. eaax3567.

81. Nestić, D., et al., αvβ3 Integrin Is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26. J Virol, 2019. 93(1).

Ocjena rada u tijeku

82. Nestić, D., et al., Human Adenovirus Type 26 Infection Mediated by αvβ3 Integrin Is Caveolin-1-Dependent. Microbiology Spectrum, 2022. 10(4): p. e01097-22.

83. Zhao, Z., A.C. Anselmo, and S. Mitragotri, Viral vector-based gene therapies in the clinic. Bioengineering & Translational Medicine, 2022. 7(1): p. e10258.

84. Cox, F., et al., Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge. PLoS One, 2018. 13(8): p. e0202820.

85. Baden, L.R., et al., Induction of HIV-1-specific mucosal immune responses following intramuscular recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 vaccination of humans. J Infect Dis, 2015. 211(4): p. 518-28.

86. Geisbert, T.W., et al., Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. J Virol, 2011. 85(9): p. 4222-33.

87. Teigler, J.E., M.J. Iampietro, and D.H. Barouch, Vaccination with adenovirus serotypes 35, 26, and 48 elicits higher levels of innate cytokine responses than adenovirus serotype 5 in rhesus monkeys. J Virol, 2012. 86(18): p. 9590-8.

88. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis. Annu Rev Biochem, 2009. 78: p. 857-902.

89. Cantón, I. and G. Battaglia, Endocytosis at the Nanoscale. Chemical Society reviews, 2012. 41: p. 2718-39.

90. Mayor, S., R.G. Parton, and J.G. Donaldson, Clathrin-independent pathways of endocytosis. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. 6(6).

91. Meier, O. and U.F. Greber, Adenovirus endocytosis. The Journal of Gene Medicine, 2004. 6(S1): p. S152-S163.

92. Pearse, B.M., C.J. Smith, and D.J. Owen, Clathrin coat construction in endocytosis. Curr Opin Struct Biol, 2000. 10(2): p. 220-8.

Ocjena rada u tijeku

93. McMahon, H.T. and E. Boucrot, Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011. 12(8): p. 517-533.

94. Rothberg, K.G., et al., Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell, 1992. 68(4): p. 673-82.

95. Yousuf, M.A., et al., Caveolin-1 associated adenovirus entry into human corneal cells. PLoS One, 2013. 8(10): p. e77462.

96. Pelkmans, L., et al., Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. Cell, 2004. 118(6): p. 767-80.

97. Luisoni, S. and U.F. Greber, 2 - Biology of Adenovirus Cell Entry: Receptors, Pathways, Mechanisms, in Adenoviral Vectors for Gene Therapy (Second Edition), D.T. Curiel, Editor. 2016, Academic Press: San Diego. p. 27-58.

98. Guzman, E., et al., Transduction of skin-migrating dendritic cells by human adenovirus 5 occurs via an actin-dependent phagocytic pathway. J Gen Virol, 2016. 97(10): p. 2703-2718.

99. Elkin, S.R., A.M. Lakoduk, and S.L. Schmid, Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. Wien Med Wochenschr, 2016. 166(7-8): p. 196-204.

100. Scott, C.C., F. Vacca, and J. Gruenberg, Endosome maturation, transport and functions. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014. 31: p. 2-10.

101. Salzman, N.H. and F.R. Maxfield, Intracellular fusion of sequentially formed endocytic compartments. J Cell Biol, 1988. 106(4): p. 1083-91.

102. Tu, Y., et al., Endosome-to-TGN Trafficking: Organelle-Vesicle and Organelle-Organelle Interactions. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020. Volume 8 - 2020.

103. Mellman, I., R. Fuchs, and A. Helenius, Acidification of the endocytic and exocytic pathways. Annu Rev Biochem, 1986. 55: p. 663-700.

Ocjena rada u tijeku

104. Di Paolo, G. and P. De Camilli, Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature, 2006. 443(7112): p. 651-7.

105. Johnson, D.S. and Y.H. Chen, Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. Current Opinion in Pharmacology, 2012. 12(4): p. 458-463.

106. Xu, L., et al., The Regulation of Rab GTPases by Phosphorylation. Biomolecules, 2021. 11(9).

107. Wandinger-Ness, A. and M. Zerial, Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. 6(11): p. a022616.

108. Hu, Y.B., et al., The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. Transl Neurodegener, 2015. 4: p. 18.

109. Huotari, J. and A. Helenius, Endosome maturation. Embo j, 2011. 30(17): p. 3481-500.

110. Mercer, J., M. Schelhaas, and A. Helenius, Virus entry by endocytosis. Annu Rev Biochem, 2010. 79: p. 803-33.

111. Zerial, M. and H. McBride, Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(2): p. 107-17.

112. Mishra, A., et al., Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C₂H₂ zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. 107(24): p. 10866-10871.

113. Humphries, W.H.t., C.J. Szymanski, and C.K. Payne, Endo-lysosomal vesicles positive for Rab7 and LAMP1 are terminal vesicles for the transport of dextran. PLoS One, 2011. 6(10): p. e26626.

114. Nestić, D., et al., The Revolving Door of Adenovirus Cell Entry: Not All Pathways Are Equal. Pharmaceutics, 2021. 13(10).

115. Mittereder, N., K.L. March, and B.C. Trapnell, Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. J Virol, 1996. 70(11): p. 7498-509.

Ocjena rada u tijeku

116. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.

117. Nagano, M., et al., Rab5-mediated endosome formation is regulated at the trans-Golgi network. Communications Biology, 2019. 2(1): p. 419.

118. Ganley, I.G., et al., Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. Mol Biol Cell, 2004. 15(12): p. 5420-30.

119. Miyazawa, N., et al., Fiber Swap between Adenovirus Subgroups B and C Alters Intracellular Trafficking of Adenovirus Gene Transfer Vectors. Journal of Virology, 1999. 73(7): p. 6056-6065.

120. Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield, Endocytosis. Physiol Rev, 1997. 77(3): p. 759-803.

121. Mistchenko, A.S., et al., Cytokines in adenoviral disease in children: Association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. The Journal of Pediatrics, 1994. 124(5): p. 714-720.

122. Akira, S. and K. Takeda, Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.

123. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.

124. Kawai, T. and S. Akira, Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. Trends Mol Med, 2007. 13(11): p. 460-9.

125. Suomalainen, M., et al., Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. Embo j, 2001. 20(6): p. 1310-9.

126. Singh, R.K., A.K. Najmi, and S.G. Dastidar, Biological functions and role of mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2 (MK2) in inflammatory diseases. Pharmacol Rep, 2017. 69(4): p. 746-756.

Ocjena rada u tijeku

127. Muruve, D.A., The innate immune response to adenovirus vectors. Hum Gene Ther, 2004. 15(12): p. 1157-66.

128. Borgland, S.L., et al., Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-kappaB. J Virol, 2000. 74(9): p. 3941-7.

129. Kim, B.H., et al., Inhibitory effect of chroman carboxamide on interleukin-6 expression in response to lipopolysaccharide by preventing nuclear factor-kappaB activation in macrophages. Eur J Pharmacol, 2006. 543(1-3): p. 158-65.

130. Hiscott, J., Convergence of the NF-κB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2007. 18(5): p. 483-490.

131. Guo, J. and S.L. Friedman, Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010. 3: p. 21.

132. Zughaier, S.M., et al., Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. Infect Immun, 2005. 73(5): p. 2940-50.

133. Zabdeno. [cited 2025. 05.05.]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zabdeno.

134. Jcovden. [cited 2025. 05.05.]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/jcovden.

135. Sputnik V. [cited 2025. 05.05.]; Available from: https://sputnikvaccine.com/.

136. <davor.nestic.pdf>.

137. Smith, C.M., et al., Inhibition of clathrin by pitstop 2 activates the spindle assembly checkpoint and induces cell death in dividing HeLa cancer cells. Mol Cancer, 2013. 12: p. 4.

138. Willox, A.K., Y.M.E. Sahraoui, and S.J. Royle, Non-specificity of Pitstop 2 in clathrin-mediated endocytosis. Biology Open, 2014. 3(5): p. 326-331.

Ocjena rada u tijeku

139. Teigler, J.E., J.C. Kagan, and D.H. Barouch, Late Endosomal Trafficking of Alternative Serotype Adenovirus Vaccine Vectors Augments Antiviral Innate Immunity. Journal of Virology, 2014. 88(18): p. 10354-10363.

140. Chardonnet, Y. and S. Dales, Early events in the interaction of adenoviruses with Hela cells: II. Comparative observations on the penetration of types 1, 5, 7, and 12. Virology, 1970. 40(3): p. 478-485.

141. Cook, N.R., P.E. Row, and H.W. Davidson, Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. Traffic, 2004. 5(9): p. 685-99.

142. Meier, O., et al., Early steps of clathrin-mediated endocytosis involved in phagosomal escape of Fcgamma receptor-targeted adenovirus. J Virol, 2005. 79(4): p. 2604-13.

143. Skjeldal, F.M., et al., De novo formation of early endosomes during Rab5-to-Rab7a transition. Journal of Cell Science, 2021. 134(8).

144. Simonsen, A., et al., EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. Nature, 1998. 394(6692): p. 494-8.

145. Sun, M., et al., Control of Rab7a activity and localization through endosomal type Igamma PIP 5-kinase is required for endosome maturation and lysosome function. Faseb j, 2020. 34(2): p. 2730-2748.

146. Kleinberger, T., En Guard! The Interactions between Adenoviruses and the DNA Damage Response. Viruses, 2020. 12(9).

147. Murray, J.L., et al., Rab9 GTPase Is Required for Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1, Filoviruses, and Measles Virus. Journal of Virology, 2005. 79(18): p. 11742-11751.

148. Choi, J. and D. DiMaio, Noncanonical Rab9a action supports retromer-mediated endosomal exit of human papillomavirus during virus entry. PLOS Pathogens, 2023. 19(9): p. e1011648.

Ocjena rada u tijeku

149. Cui, S., et al., NDP52 mediates an antiviral response to hepatitis B virus infection through Rab9-dependent lysosomal degradation pathway. Nature Communications, 2023. 14(1): p. 8440.

150. Lin, S.X., et al., Endocytosed cation-independent mannose 6-phosphate receptor traffics via the endocytic recycling compartment en route to the trans-Golgi network and a subpopulation of late endosomes. Mol Biol Cell, 2004. 15(2): p. 721-33.

151. Reddy, J.V., et al., A functional role for the GCC185 golgin in mannose 6-phosphate receptor recycling. Mol Biol Cell, 2006. 17(10): p. 4353-63.

152. Lam, E., et al., Effective Apical Infection of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cells and Induction of Proinflammatory Chemokines by the Highly Pneumotropic Human Adenovirus Type 14p1. PLOS ONE, 2015. 10(7): p. e0131201.

153. Leland Booth, J. and J.P. Metcalf, Type-Specific Induction of Interleukin-8 by Adenovirus. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1999. 21(4): p. 521-527.

154. Casiraghi, C., T. Gianni, and G. Campadelli-Fiume, αvβ3 Integrin Boosts the Innate Immune Response Elicited in Epithelial Cells through Plasma Membrane and Endosomal Toll-Like Receptors. J Virol, 2016. 90(8): p. 4243-4248.

155. Acharya, M., et al., αv Integrins combine with LC3 and atg5 to regulate Toll-like receptor signalling in B cells. Nature Communications, 2016. 7(1): p. 10917.

156. Rajaiya, J., et al., Human adenovirus type 19 infection of corneal cells induces p38 MAPK-dependent interleukin-8 expression. Virology Journal, 2008. 5(1): p. 17.

157. Al-Fahad, D., B. Alharbi, and P. Dash, Roles of Endocytic Processes and Early Endosomes on Focal Adhesion Dynamics in MDA-MB-231 Cells. Reports of Biochemistry and Molecular Biology, 2021. 10: p. 2.

158. Macé, G., et al., Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis. Embo j, 2005. 24(18): p. 3235-46.

Ocjena rada u tijeku

159. Han, J., J. Wu, and J. Silke, An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling [version 1; peer review: 2 approved]. F1000Research, 2020. 9(653).

160. Scatena, M., et al., NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. J Cell Biol, 1998. 141(4): p. 1083-93.

161. Urbinati, C., et al., αvβ3-integrin-dependent activation of focal adhesion kinase mediates NF-κB activation and motogenic activity by HIV-1 Tat in endothelial cells. Journal of Cell Science, 2005. 118(17): p. 3949-3958.

162. Kawai, T. and S. Akira, Toll-like receptor downstream signaling. Arthritis Res Ther, 2005. 7(1): p. 12-9.

163. Zhu, J., X. Huang, and Y. Yang, Innate Immune Response to Adenoviral Vectors Is Mediated by both Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways. Journal of Virology, 2007. 81(7): p. 3170-3180.

164. Zhao, X., et al., IRF3 Negatively Regulates Toll-Like Receptor-Mediated NF-κB Signaling by Targeting TRIF for Degradation in Teleost Fish. Frontiers in Immunology, 2018. Volume 9 - 2018.

165. Xia, X., et al., NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF-κB signaling by targeting TRAF6 and IKK. Immunity, 2011. 34(6): p. 843-53.

166. Browning, D.D., et al., Autocrine regulation of interleukin-8 production in human monocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 279(6): p. L1129-36.

167. Gais, P., et al., TRIF signaling stimulates translation of TNF-alpha mRNA via prolonged activation of MK2. J Immunol, 2010. 184(10): p. 5842-8.

168. Vercammen, E., J. Staal, and R. Beyaert, Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3. Clinical Microbiology Reviews, 2008. 21(1): p. 13-25.

169. Alhamdan, F., G. Bayarsaikhan, and K. Yuki, Toll-like receptors and integrins crosstalk. Front Immunol, 2024. 15: p. 1403764.

Ocjena rada u tijeku

170. Chen, Z., et al., Integrin β3 Modulates TLR4-Mediated Inflammation by Regulation of CD14 Expression in Macrophages in Septic Condition. Shock, 2020. 53(3): p. 335-343.

171. Hou, Y.F., et al., Modulation of expression and function of Toll-like receptor 3 in A549 and H292 cells by histamine. Mol Immunol, 2006. 43(12): p. 1982-92.

172. Groskreutz, D.J., et al., Respiratory Syncytial Virus Induces TLR3 Protein and Protein Kinase R, Leading to Increased Double-Stranded RNA Responsiveness in Airway Epithelial Cells1. The Journal of Immunology, 2006. 176(3): p. 1733-1740.

173. Hood, I.V., et al., Crystal structure of an adenovirus virus-associated RNA. Nature Communications, 2019. 10(1): p. 2871.

174. Price, A.M., et al., Adenovirus prevents dsRNA formation by promoting efficient splicing of viral RNA. Nucleic Acids Res, 2022. 50(3): p. 1201-1220.

175. Eichholz, K., et al., Adenovirus-α-Defensin Complexes Induce NLRP3-Associated Maturation of Human Phagocytes via Toll-Like Receptor 4 Engagement. J Virol, 2022. 96(6): p. e0185021.

176. Chéneau, C., et al., Lactoferrin Retargets Human Adenoviruses to TLR4 to Induce an Abortive NLRP3-Associated Pyroptotic Response in Human Phagocytes. Front Immunol, 2021. 12: p. 685218.

Ocjena rada u tijeku

8. Sažetak

Ocjena rada u tijeku

Adenovirusni vektori uspješno se primjenjuju u terapiji kod ljudi, a sve se više istražuju i u liječenju tumora. Najčešće korišteni vektori temelje se na adenovirusu tipa 5 (HAdV-C5), no njihova je primjena ograničena zbog prethodno stečene imunosti kod većine populacije. Zbog toga raste interes za adenoviruse niske seroprevalencije, poput adenovirusa tipa 26 (HAdV-D26) s kojim je manji broj ljudi tijekom života bio u kontaktu.

Naši prethodni rezultati identificirali su integrin αvβ3 kao receptor za ulazak HAdV-D26 u stanice epitela čovjeka, ali i pokazali da HAdV-D26 u stanice A549 i A549-E6, koje se razlikuju po količini integrina αvβ3, ulazi na različit način. Dodatno, opisano je i da inhibicija klatrinom-posredovane endocitoze uzrokuje bolje vezanje, internalizaciju i transdukciju HAdV-D26, ali ne utječe na količinu integrina αvβ3 na površini stanice, kao i da tijekom tretmana inhibitorom klatrinom-posredovane endocitoze HAdV-D26 zaostaje u blizini membrane stanice. Kako je poznato da rana interakcija između adenovirusa i stanice - putem receptora, određuje ulazak i unutarstanično putovanje virusa, a uzimajući u obzir i različit mehanizam ulaska HAdV-D26 u stanice epitela čovjeka, pretpostavljeno je da promijenjeno unutarstanično putovanje HAdV-D26 omogućava kretanje virusa kroz različite endosomalne odjeljke i stimulira urođeni imunosni odgovor na drugačiji način. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio detaljnije opisati unutarstanično putovanje HAdV-D26 i istražiti hoće li promjena endocitoze i unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 utjecati na drugačiju aktivaciju ranog urođenog imunosnog odgovora u stanicama epitela čovjeka.

Korištenjem modela stanica A549, A549 kojima je inhibirana klatrinom-posredovana endocitoza i stanica A549-E6 praćena je lokalizacija HAdV-D26 u ranim i kasnim endosomima/lizosomima gdje je u stanicama A549 većina HAdV-D26 u ranoj fazi transdukcije lokalizirana u ranom endosomu, dok je u kasnijim fazama uglavnom prisutna u kasnom endosomu/lizosomu. U stanicama A549 kojima je inhibirana klatrinom-posredovana endocitoza uočena je smanjena lokalizacija HAdV-D26 kako u ranom, tako i u kasnom endosomu. Osim toga, u stanicama A549-E6 virus manje lokalizira u ranom endosomu i u njemu se zadržava duže nego u stanicama A549, ali i brže izlazi iz kasnog endosoma/lizosoma. Dodatno, pokazano je da Rab9, protein uključen u regulaciju putovanja endosoma unutar stanice, ima ulogu u nakupljanju HAdV-D26 u kasnim endosomima/lizosomima. Naime, smanjenje količine proteina Rab9 uzrokovalo je

Ocjena rada u tijeku

povećano oslobađanje HAdV-D26 iz kasnih endosoma/lizosoma, a posljedično i povećalo količinu DNA HAdV-D26 u jezgri.

Uočeno promijenjeno unutarstanično putovanje HAdV-D26 utjecalo je i na različitu aktivaciju urođenog imunosnog odgovora. U stanicama A549 u kojima HAdV-D26 neometano putuje unutar endosoma, virus najvjerojatnije biva prepoznat od strane TLR3 čime se signal nizvodno prenosi regrutacijom adaptora TICAM-1, odnosno dolazi do aktivacije puteva uključenih u ekspresiju *IL8*. U stanicama A549-E6, u kojima adenovirus također putuje unuta endosoma, još ne definiran tip TLR-a prepoznaje HAdV-D26, dolazi do regrutacije adaptora MyD88 te aktivacije puteva uključenih u ekspresiju *IL8*. U stanicama A549 i A549-E6 kojima je inhibirana klatrinom-posredovana endocitoza i HAdV-D26 je zaustavljen u blizini membrane stanice, virus najvjerojatnije biva prepoznat od strane TLR3 što regrutacijom adaptora TICAM-1 aktivira puteve uključene u ekspresiju *IL6* i *IL8*.

Rezultati ove doktorske disertacije naglašavaju važnost razumijevanja unutarstaničnog putovanja HAdV-D26 jer ono izravno utječe na aktivaciju urođenog imunosnog odgovora te pridonose boljem razumijevanju osnovne biologije ovog virusa i mogu poslužiti kao znanstvena podloga za razvoj učinkovitijih i sigurnijih vektora temeljenih na HAdV-D26 za terapijsku primjenu kod ljudi.

Ocjena rada u tijeku

9. Summary

Ocjena rada u tijeku

Adenoviral vectors are used in human therapy and are increasingly being investigated for cancer treatment. The most commonly used vectors are based on adenovirus type 5 (HAdV-C5), but their application is limited due to pre-existing immunity in most of the population. Therefore, interest is growing for adenoviruses with low seroprevalence, such as adenovirus type 26 (HAdV-D26), with which fewer people have been in contact during their lifetime.

Our previous results identified integrin αvβ3 as the receptor for HAdV-D26 entry into human epithelial cells. Also, they showed that HAdV-D26 enters A549 and A549-E6 cells, which differ in the amount of integrin αvβ3 expressed on their surface, by different mechanisms. Additionally, it has been reported that inhibition of clathrin-mediated endocytosis enhances binding, internalization, and transduction of HAdV-D26, but does not affect the surface levels of integrin αvβ3. Under conditions of clathrin-mediated endocytosis inhibition, HAdV-D26 remains near the cell membrane. Since early interactions between adenoviruses and the host cell—through receptors—determine viral entry and intracellular trafficking, and considering the distinct entry mechanism of HAdV-D26 in human epithelial cells, it has been hypothesized that altered intracellular trafficking of HAdV-D26 allows the virus to pass through different endosomal compartments and stimulates the innate immune response differently. Therefore, this doctoral dissertation aimed to describe the intracellular trafficking of HAdV-D26 in more detail and to investigate whether changes in endocytosis and trafficking affect the activation of the early innate immune response in human epithelial cells.

Using A549 cells, A549 cells with inhibited clathrin-mediated endocytosis, and A549-E6 cells, the localization of HAdV-D26 was monitored in early and late endosomes/lysosomes. In A549 cells, most HAdV-D26 localized to early endosomes during the initial phase of transduction, while at later stages, it was predominantly present in late endosomes/lysosomes. In A549 cells with inhibited clathrin-mediated endocytosis, HAdV-D26 showed reduced localization to both early and late endosomes. In A549-E6 cells, the virus localized less to early endosomes and remained there longer than in A549 cells, but also exited late endosomes/lysosomes more rapidly. Additionally, it was shown that Rab9, a protein involved in the regulation of endosomal trafficking, plays a role in the accumulation of HAdV-D26 in late endosomes/lysosomes. Specifically, reduction of Rab9

Ocjena rada u tijeku

levels led to increased release of HAdV-D26 from late endosomes/lysosomes, and consequently, to an increased amount of HAdV-D26 DNA in the nucleus.

The observed changes in intracellular trafficking of HAdV-D26 also affected the activation of the innate immune response. In A549 cells, where HAdV-D26 travels through endosomes without interference, the virus is likely recognized by TLR3, which signals downstream via the adaptor TICAM-1, leading to activation of pathways involved in IL8 expression. In A549-E6 cells, where the virus also travels through endosomes, a yet undefined TLR appears to recognize HAdV-D26, leading to recruitment of the adaptor MyD88 and activation of pathways involved in IL8 expression. In A549 and A549-E6 cells with inhibited clathrin-mediated endocytosis, where HAdV-D26 is retained near the cell membrane, the virus is most likely recognized by TLR3, and TICAM-1 recruitment activates pathways involved in both IL6 and IL8 expression.

The results of this doctoral dissertation emphasize the importance of understanding the intracellular trafficking of HAdV-D26, as it directly influences the activation of the innate immune response. These findings contribute to a better understanding of the basic biology of this virus and may serve for the development of more efficient and safer HAdV-D26-based vectors for therapeutic applications in humans.

Ocjena rada u tijeku

10. Životopis i popis publikacija

Ocjena rada u tijeku

Rođena sam 22. rujna 1996. godine u Zagrebu. Nakon završetka osnovne i srednje škole upisala sam preddiplomski studij Biotehnologije te diplomski studij Molekularne biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 2020. godine među 10 % najboljih studenata. Diplomski rad pod naslovom „Uloga proteina uključenih u adheziju u otpornosti stanica raka prostate LNCaP na zračenje“ izradila sam u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, u sklopu projekta „Udruživanjem temeljnih i kliničkih znanstvenih istraživanja do poboljšanja tretmana i povećane društvene osviještenosti o raku prostate“ (Moj Zaba Start 2019). Iste godine zaposlila sam se kao asistent u istraživanju na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Endocitoza adenovirusa i urođeni imunosni odgovor“ pod vodstvom dr. sc. Dragomire Majhen. Paralelno sam upisala poslijediplomski doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Tijekom prve godine doktorata održala sam online predavanje pod naslovom „Infekcija adenovirusom izaziva značajan i raznolik urođeni imunosni odgovor u epitelnim stanicama čovjeka“ u sklopu 14. Internacionalnog kongresa o adenovirusima. Također sam sudjelovala u emisiji Znanstveni krugovi na HRT-u, gdje sam široj javnosti predstavila istraživanja našeg laboratorija. Aktivno sam sudjelovala u popularizaciji znanosti kroz događanja poput 10. Znanstvenog piknika u Gornjoj Stubici te Otvorenih dana Instituta Ruđer Bošković s izlaganjem „Napredak tehnologije, napredak je i znanosti?“ U drugoj godini doktorata pohađala sam Training School: Adjuvants and Vaccine Formulation održan u Ženevi, Švicarska. Od sredine 2022. do sredine 2023. bila sam na rodiljnom dopustu, nakon čega sam provela mjesec dana na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Cardiffu (Ujedinjeno Kraljevstvo), u istraživačkoj grupi prof. Alana Parkera. Za to putovanje dobila sam stipendije programa INVECTA (Marie Skłodowska-Curie Actions – MSCA) te stipendiju za kratkoročne boravke mladih istraživača u inozemnim laboratorijima Instituta Ruđer Bošković. Krajem 2024. godine održala sam predavanje na 4. simpoziju studenata biotehnologije na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova u Rijeci. Tijekom doktorskog obrazovanja mentorirala sam izradu dva diplomska rada i jedne laboratorijske prakse. Također sam pohađala radionicu „NextGenerationEU: Kako objaviti znanstveni rad u časopisu s visokim faktorom odjeka“ i sudjelovala u organizaciji 15. Internacionalnog kongresa o adenovirusima, održanog na Braču. Član sam Hrvatskog mikrobiološkog društva (Federation of European Microbiological

Ocjena rada u tijeku

Societies). Koautorica sam četiri sažetka sa znanstvenih skupova te četiri znanstvena rada. Prva sam autorica jednog rada, dok na još dva rada dijelim prvo autorstvo.

Popis publikacija:

- Imaging analysis of adenovirus particles during the cell entry and intracellular trafficking (2025) **I Drašković***, LL Horvat*, K Božinović*, D Majhen Adenoviral Vectors for Gene Therapy, 501-544

- Interactions of variously coated gold and silver nanoparticles with a bis (triarylborane) photodynamic therapy (PDT)-dye; their cellular uptake, cytotoxicity and photo-activity (2023) **I. Drašković**, I. Fabijanić, M. Ferger, T. B. Marder, D. Majhen, I. Piantanida. Periodicum biologorum 125 (1-2), 65-74.

- Triarylborane-"Click" Fluorescent Tag for Orthogonal Amino Acid Labelling, Interactions with DNA, Protein, and Cyclodextrins (2023) M. Jurković, M. Ferger, I. Drašković, T. B. Marder, I. Piantanida. Pharmaceuticals 16 (9), 1208.

- Para-N-Methylpyridinium Pyrenes: Impact of Positive Charge on ds-DNA/RNA and Protein Recognition, Photo-Induced Bioactivity, and Intracellular Localisation (2022) M. Košćak, I. Pehar, K. Božinović, G. K. Kole, S. Sobočanec, I. I. Podgorski, M. Pinterić, K. Müller-Buschbaum, D. Majhen, I. Piantanida. Pharmaceutics 14 (11), 2499.

- Human Adenovirus Type 26 Induced IL-6 Gene Expression in an αvβ3 Integrin-and NF-κB-Dependent Manner (2021) D. Nestić, K. Božinović, I. Drašković, A. Kovačević, J. van den Bosch, et al. Viruses 14 (4), 672.

- The revolving door of adenovirus cell entry: not all pathways are equal (2021) D. Nestić*, K. Božinović*, **I. Pehar***, R. Wallace, A. L. Parker, D. Majhen. Pharmaceutics 13 (10), 1585.

- Bis-Pyrene Photo-Switch Open-and Closed-Form Differently Bind to ds-DNA, ds-RNA and Serum Albumin and Reveal Light-Induced Bioactivity (2021) I. Orehovec, M. Matković, I. Pehar, D. Majhen, I. Piantanida. International Journal of Molecular Sciences 22 (9), 4916.

*dijeljeno prvo autorstvo

Ocjena rada u tijeku