

Uloga endocitoze posredovane klatrinom u ekspresiji upalnih citokina nakon infekcije adenovirusom tipa 26

Vrbančić, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:013682>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lea Vrbančić

**Uloga endocitoze posredovane klatrinom u
ekspresiji upalnih citokina nakon infekcije
adenovirusom tipa 26**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lea Vrbančić

**Role of clathrin mediated endocytosis in
adenovirus type 26 induced expression of
inflammatory cytokines**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod voditeljstvom dr.sc. Dragomire Majhen, više znanstvene suradnice, te suvoditeljstvom izv.prof.dr.sc. Silvije Černi. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga endocitoze posredovane klatrinom u ekspresiji upalnih citokina nakon infekcije adenovirusom tipa 26

Lea Vrbančić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Adenovirusni vektori se već dugo koriste u genskoj terapiji te za razvoj cjepiva protiv zaraznih bolesti. Najbolje proučeni adenovirusi tipa 2 i 5 imaju visoku seroprevalenciju u ljudskoj populaciji što ograničava njihovo korištenje kao vektora. Vektori temeljeni na niskoseroprevalentnom adenovirusu tipa 26 ističu se kao dobri kandidati za razvoj cjepiva jer potiču snažan i dugotrajan imunski odgovor. Cilj ovog istraživanja bilo je ispitati ulogu endocitoze posredovane klatrinom u imunskom odgovoru epitelnih stanica na infekciju adenovirusom tipa 26. Epitelnim stanicama adenokarcinoma pluća inhibirana je endocitoza posredovana klatrinom nakon čega su inficirane adenovirusom tipa 26. Stanicama je potom metodom qPCR određena ekspresija gena za pro-upalne citokine IL-6, IL-8 i IFN- α te metodom ELISA izmjerena količina izlučenih citokina IL-6 i IL-8 24 sata nakon infekcije. Kako bi se istražio utjecaj endocitoze posredovane klatrinom na aktivaciju signalnih puteva uslijed infekcije, westernskom analizom određena je aktivacija MAP kinaza ERK i p38 te transkripcijskog faktora NF κ B. Rezultati pokazuju da inhibicija endocitoze posredovane klatrinom povećava ekspresiju gena za citokine te njihovo izlučivanje iz stanica uslijed infekcije adenovirusom tipa 26. Pokazano je da ovaj imunski odgovor stanica nastaje aktivacijom signalnih puteva p38, ali ne i signalnih puteva ERK, neovisno o transkripcijskom faktoru NF κ B.

(60 stranica, 14 slika, 11 tablica, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: urođeni imunski odgovor, adenovirusni vektori

Voditelj: dr.sc. Dragomira Majhen, viša znanstvena suradnica

Suvoditelj: izv.prof.dr.sc. Silvija Černi

Ocjenitelji: izv.prof.dr.sc. Silvija Černi

dr.sc. Dragomira Majhen, viša znanstvena suradnica

v.pred.dr.sc. Julija Erhardt

prof.dr.sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 4.11.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Role of clathrin mediated endocytosis in adenovirus type 26 induced expression of inflammatory cytokines

Lea Vrbančić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Adenovirus have long been used as vectors in gene therapy and for development of vaccines against infectious diseases. The most investigated adenovirus type 2 and 5 have a high seroprevalence in human population which limits their use as vectors. Vectors based on adenovirus type 26, which has low seroprevalence, are recognized as good candidates for vaccination because they elicit a strong and long-lasting immune response. The aim of this study was to investigate the role of clathrin mediated endocytosis in adenovirus type 26 induced immune response in epithelial cells. Clathrin mediated endocytosis was inhibited in human lung adenocarcinoma cells, after which they were infected. After treatment and infection, the level of gene expression for pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and IFN- α was determined in cells by qPCR and the level of cytokines IL-6 and IL-8 secreted 24 hours after infection was determined by ELISA. In order to investigate the role of clathrin mediated endocytosis in activation of signaling pathways induced by infection, activation of MAP kinases ERK and p38, as well as transcription factor NF κ B was determined by Western blot analysis. Results show that inhibition of clathrin mediated endocytosis increases adenovirus type 26 induced gene expression of cytokines as well as their secretion. Observed immune response was generated via activation of p38, but not ERK signaling pathways, independently of NF κ B.

(60 pages, 14 figures, 11 tables, 77 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: innate immune response, adenoviral vectors

Supervisor: Dragomira Majhen, PhD, Senior Research Associate

Co-supervisor: Silvija Černi, PhD, Associate Professor

Reviewers: Silvija Černi, PhD, Associate Professor

Dragomira Majhen, PhD, Senior Research Associate

Julija Erhardt, PhD, Senior Lecturer

Biljana Balen, PhD, Professor

Thesis accepted: 4.11.2021.

Zahvaljujem dr. sc. Dragomiri Majhen na mentorstvu, nesebičnoj pomoći, savjetima i potpori.

Hvala izv. prof. dr. sc. Silviji Černi na uloženom trudu i ukazanom povjerenju.

Veliko hvala najdražem Adenotimu – hvala vam na svim savjetima, strpljenju i ugodnom druženju. Posebno hvala Isabeli na potpori i bodrenju tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala i svim djelatnicima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala na ugodnoj radnoj atmosferi koja mi je uljepšala izradu ovog diplomskog rada.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na slušanju, brizi i potpori tijekom cjelokupnog studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Adenovirusi čovjeka	1
1.2. Građa adenovirusa	2
1.3. Replikativni ciklus adenovirusa	3
1.3.1. Vezanje na receptore	4
1.3.2. Ulazak u stanice	6
1.3.3. Endocitoza posredovana klatrinom	7
1.3.4. Izlazak iz endosoma i putovanje do jezgre	8
1.3.5. Unos genoma u jezgru te nastanak novih virusnih čestica	9
1.4. Imunosni odgovor i prijenos signala potaknut ulaskom adenovirusa u stanicu	10
1.5. Adenovirus tipa 26 (HAdV26)	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Kemikalije	15
3.1.2. Kompleti kemikalija	17
3.1.3. Kemijski inhibitor endocitoze posredovane klatrinom	17
3.1.4. Početnice	17
3.1.5. Protutijela	18
3.1.6. Stanične linije	19
3.1.7. Adenovirusi	20
3.1.8. Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali	20
3.1.9. Računalni programi	21

3.2. Metode.....	21
3.2.1. Kultura stanica.....	21
3.2.2. Umnažanje i pročišćavanje replikacijski defektnog virusa centrifugiranjem u cezijevoj kloridu (CsCl).....	22
3.2.3. Inhibicija endocitoze posredovane klatrinom i infekcija virusom HAdV26.....	24
3.2.4. Određivanje promjena u ekspresiji gena za citokine potaknutih infekcijom.....	24
3.2.4.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA.....	24
3.2.4.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR).....	26
3.2.5. Određivanje količine izlučenih citokina.....	28
3.2.6. Analiza količine proteina kaskade MAPK.....	28
3.2.6.1. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza.....	28
3.2.6.2. Westernska analiza.....	30
4. REZULTATI.....	32
4.1. Umnažanje virusa u stanicama HEK-293 te pročišćavanje na jastučiću i u gradijentu CsCl	32
4.2. Utjecaj inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na ekspresiju gena za citokine IL-6, IL-8 i IFN- α potaknutu infekcijom	34
4.3. Utjecaj inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na količinu izlučenih citokina IL-6 i IL-8 uslijed infekcije.....	38
4.4. Utjecaj inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na aktivaciju proteina signalne kaskade MAPK nakon infekcije.....	40
5. RASPRAVA.....	45
6. ZAKLJUČCI.....	51
7. LITERATURA.....	52
8. ŽIVOTOPIS.....	60

POPIS KRATICA

A549 stanice - stanice adenokarcinoma pluća čovjeka (eng. *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*)

CsCl – cezijev klorid

DMEM – Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

eGFP – zeleni fluorescentni protein (eng. *green fluorescent protein*)

ELISA - enzimski imunotest na čvrstoj fazi (eng. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

ERK - kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinase*)

FBS - serum fetusa goveda (eng. *Fetal Bovine Serum*)

HAdV – adenovirusi koji inficiraju čovjeka (eng. *human adenovirus*)

HAdV26 - adenovirus tipa 26 (eng. *human adenovirus type 26*)

HEK-293 stanice - adherentne stanice bubrega embrija čovjeka (eng. *human embryonic kidney 293 cells*)

IFN – interferon (eng. *interferon*)

IL – interleukin (eng. *interleukin*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinase*)

NFκB – transkripcijski faktor (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

PRR – receptori za prepoznavanje patogena (eng. *pathogen recognition receptors*)

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom (eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RGD – slijed arginin-glicin-aspartat

SDS-PAGE - SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

TLR – receptori slični Tollu (eng. *Toll-like receptors*)

1. UVOD

1.1. Adenovirusi čovjeka

Adenovirusi su DNA virusi ikozaedralne kapside bez lipidne ovojnice i promjera oko 90 nm. Pripadaju porodici *Adenoviridae* koja obuhvaća 5 rodova, a mogu inficirati kralježnjake, uključujući sisavce, ptice, ribe, gmazove i vodozemce (Greber i Flatt 2019). Adenovirusi čovjeka (eng. *human adenovirus*, HAdV) pripadaju rodu *Mastadenovirus* te prema Internacionalnom odboru za taksonomiju virusa (ICTV, eng. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) obuhvaćaju više od 67 serotipova podijeljenih u 7 grupa označenih od A do G na temelju hemaglutinacije, reakcije neutralizacije seruma ili bioinformatičke analize (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Ovi virusi mogu uzrokovati infekcije dišnog, probavnog i mokraćnog sustava te infekcije očiju (Gonçalves i de Vries 2006). Kod imunokompetentnih osoba infekcija adenovirusima najčešće uzrokuje blage simptome, no ponekad infekcije mogu biti vrlo zarazne te postoje opisani slučajevi lokalnih epidemija (Nedelman 2018). Za imunodeficijentne osobe te novorođenčad infekcija virusom HAdV može imati ozbiljniji tijek te čak završiti smrću (Lion 2014).

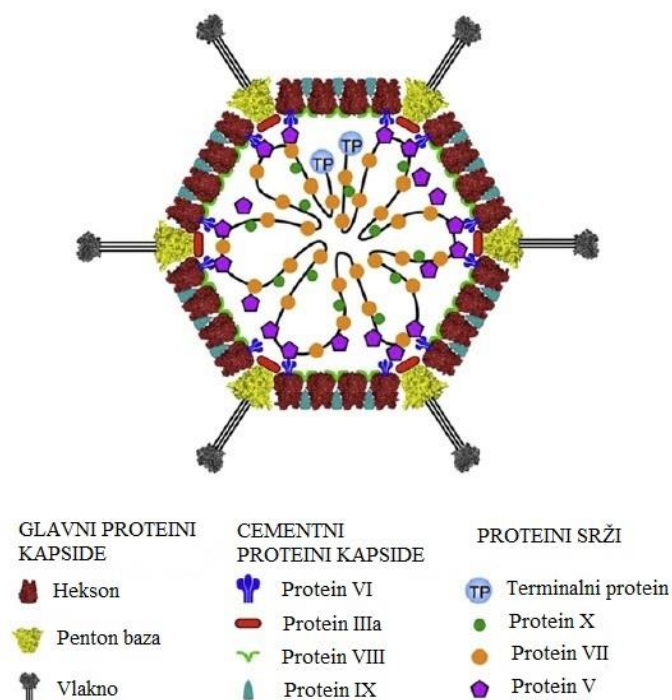
Adenovirusi se već dugu niz godina koriste kao modeli u istraživanjima različitih staničnih procesa poput transkripcije i replikacije DNA, mRNA procesiranja, ekspresije proteina, regulacije staničnog ciklusa, staničnog rasta i tumorigeneze (Greber i Flatt 2019). Najbolje proučeni i najčešće korišteni za istraživanja su adenovirusi tipa 2 i 5 (HAdV2 i HAdV5) grupe C (Gonçalves i de Vries 2006). Osim kao modeli u istraživanjima, HAdV se također koriste kao vektori u genskoj terapiji te za razvoj cjepiva protiv zaraznih bolesti. Kod genske terapije adenovirusni vektori unose željeni genetski materijal u ciljne stanice u svrhu terapije i liječenja bolesti, dok se za razvoj cjepiva koji se temelje na adenovirusnim vektorima koristi genetski materijal određenog patogena kako bi se potaknuo specifičnog imunosti odgovor i stvorila zaštita organizma (Gonçalves i de Vries 2006). Karakteristike koje čine HAdV dobrim i često korištenim vektorima su dobro poznavanje njihove biologije, visoka efikasnost dostavljanja gena u stanice, jednostavna proizvodnja u visokom titru te sposobnost aktiviranja urođenog i specifičnog imunosti odgovora domaćina (Majhen i sur. 2014, Hendrix i sur. 2014).

Jedan od problema pri korištenju virusa HAdV kao vektora je visoka seroprevalencija nekih serotipova, odnosno, postojeća imunost u obliku specifičnih antitijela. Prilikom primjene adenovirusnog vektora kod ljudi to može značiti smanjenu efikasnost dostave gena u ciljne stanice ili ne poticanje specifičnog imunosti odgovora na željeni patogen u slučaju

vakcinacije. Iz navedenih razloga, istraživanja se sve više okreću od dobro istraženih, a visoko seroprevalentnih tipova virusa HAdV (pr. HAdV5, HAdV2) prema nisko seroprevalentnim tipovima virusa HAdV, kao što je adenovirus tipa 26, HAdV26 (Abbnik i sur. 2007).

1.2. Građa adenovirusa

Adenovirusna čestica se sastoji od dva glavna dijela: srži i proteinske kapside (Slika 1.). Srž čini genom virusa povezan s proteinima V, VII i X te terminalnim proteinima koji su kovalentno vezani na 5' krajeve genoma. Glavni dio kapside čine trimeri proteina heksona, koji grade plohe kapside, te pentonske kapsomere, koje se nalaze na njenim vrhovima. Pentonske kapsomere su građene od pentamera proteina baza pentona i na njega nekovalentno vezanog vlakna. Svi serotipovi HAdV, osim serotipova 40 i 41, imaju RGD (arginin-glicin-aspartat) motiv u bazi pentona koji ima ulogu u vezanju virusa za površinu stanica domaćina. Vlakno je homotrimer građen od različitog broja β ponavljanja, ovisno o serotipu. Na C-kraju vlakna nalazi se globularna domena (tzv. glava) koja ima funkciju liganda koji se direktno veže za adenovirusne receptore na stanicama domaćina. Strukturu kapside učvršćuju cementni kapsidni proteini, protein IX koji se nalazi na vanjskoj površini kapside te proteini IIIa, VI i VIII koji se nalaze unutar kapside (Greber i Flatt 2019, Gonçalves i de Vries 2006).



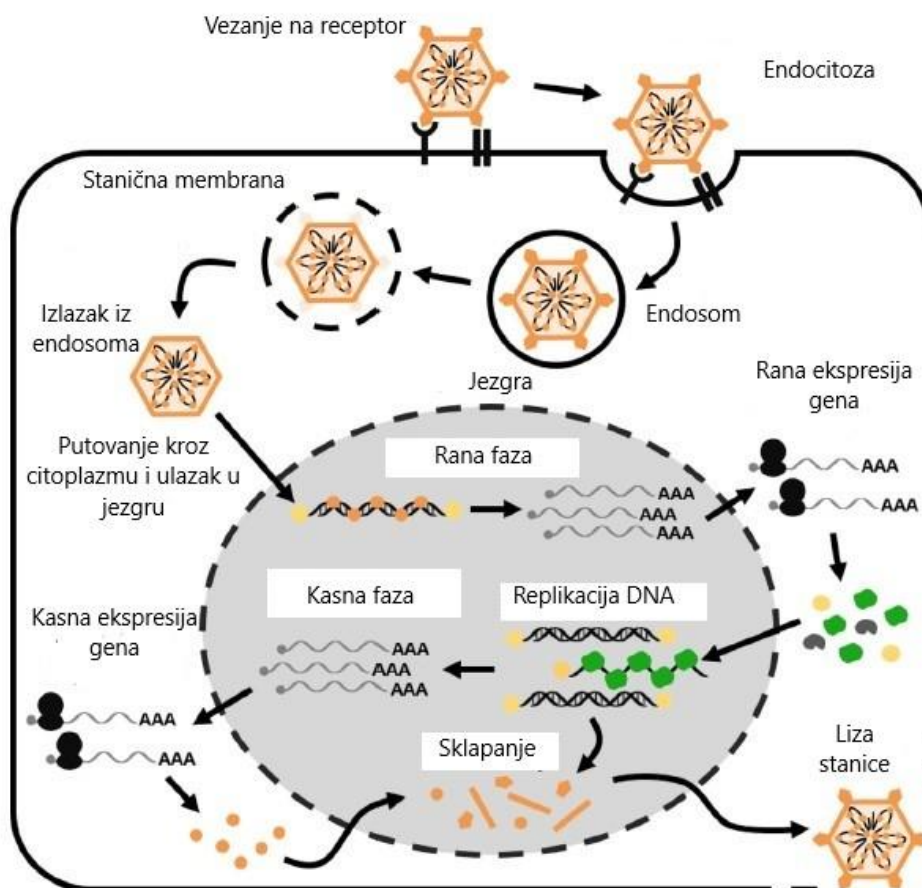
Slika 1. Shematski prikaz građe adenovirusa (preuzeto i prilagođeno iz Nemerow i sur. 2009)

Genom adenovirusa čini dvolančana DNA duljine oko 36 kb na čijim se krajevima nalaze obrnuto ponavljajuće sekvence (eng. *inverted terminal repeats*, ITRs) u kojima je sadržano ishodište replikacije genoma. Ovisno o tome eksprimiraju li se geni prije ili nakon započete replikacije virusne DNA, genom virusa HAdV može se podijeliti na rane, intermedijarne i kasne transkripcijske jedinice. Ekspresijom šest ranih transkripcijskih jedinica (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4) nastaju proteini nužni za aktivaciju ostalih virusnih proteina, replikaciju virusne DNA te proteini koji sprečavaju preranu smrt inficiranih stanica interferiranjem s imunskim odgovorom domaćina. Intermedijarne transkripcijske jedinice sadrže gene za VAI i VAII (eng. *virus-associated*) RNA molekule te za proteine IX i IV2a koji sudjeluju u transkripciji kasnih gena i slaganju novih virusnih čestica. Sve kasne transkripcijske jedinice (L1, L2, L3, L4 i L5) eksprimiraju se sa zajedničkog glavnog kasnog promotora (eng. *major late promotor*, MLP), a kodiraju za strukturne proteine virusa te one koji pomažu u sklapanju novih adenovirusnih čestica (Gonçalves i de Vries 2006, Charman i sur. 2019).

1.3. Replikativni ciklus adenovirusa

Uobičajen tijek infekcije adenovirusa može se podijeliti u nekoliko faza. Prvo dolazi do vezanja virusne čestice za receptore na stanici domaćina, zatim slijedi endocitoza, a potom bijeg

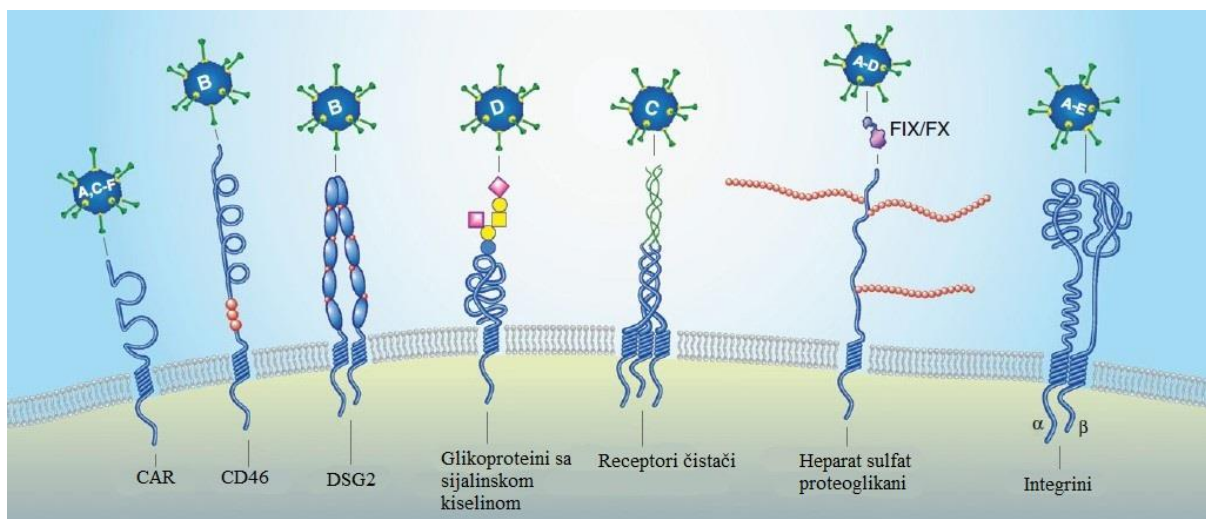
virusa iz endosoma u citoplazmu i putovanje do jezgre gdje dolazi do unosa virusne DNA u jezgru domaćina. Nakon transkripcije i replikacije virusne DNA te sinteze proteina dolazi do sklapanja novih virusnih čestica koje uslijed lize izlaze iz zaražene stanice domaćina. Shematski prikaz replikativnog ciklusa adenovirusa prikazan je na Slici 2., a pojedine faze su detaljnije opisane u sljedećim poglavljima.



Slika 2. Shematski prikaz replikativnog ciklusa adenovirusa (preuzeto i prilagođeno iz Charman i sur. 2019)

1.3.1. Vezanje na receptore

Infekcija adenovirusima počinje interakcijom vlakna i baze pentona s receptorima na staničnoj površini. Pokazano je da se HAdV mogu vezati na razne molekule na stanici domaćina (Slika 3.), a najbolje istraženi i najčešći adenovirusni receptori su: CAR (eng. *coxsackie and adenovirus receptor*), CD46, desmoglein-2, glikoproteini koji sadrže sijalinsku kiselinu te integrini (Stasiak i Stehle 2020).



Slika 3. Shematski prikaz receptora na površini stanice i grupe adenovirusa koje ih koriste (preuzeto i prilagođeno iz Arnberg 2012)

Većina adenovirusa, osim onih grupe B, veže se na CAR visokim ili niskim afinitetom pomoću petlje vlakna (Arnberg 2012). CAR je membranski protein koji sadrži dvije ekstracelularne domene nalik imunoglobulinu (Stasiak i Stehle 2020) te je uključen u procese stanične adhezije, migracije i rasta stanice (Luisoni i Greber 2016). Nalazi se na bazolateralnoj strani polariziranih epitelnih stanica gdje stvara čvrste spojeve zbog čega nije primarno dostupan adenovirusima (Nemerow 2009, Stasiak i Stehle 2020). Postoji nekoliko modela koji objašnjavaju kako CAR postaje dostupan adenovirusima za vezanje. Jedan od njih uključuje prekidanje čvrstih veza između stanica pod utjecajem stresa, a drugi naglašava ulogu makrofaga i citokina u translokaciji receptora CAR na apikalnu stranu stanica gdje postaju lako dostupni virusima (Luisoni i Greber, 2016).

Adenovirusi grupe B koriste CD46 kao primarni receptor za vezanje na stanice (Gaggar i sur. 2003). CD46 pripada obitelji regulatora aktivacije komplementa te je prisutan na svim stanicama s jezgrom kako bi zaštitio zdrave stanice od smrti posredovane aktiviranim komplementom (Luisoni i Greber 2016, Stasiak i Stehle 2020). Vezanje adenovirusa na CD46 okida različite signalne puteve i potiče ulazak virusnih čestica u stanicu makropinocitozom (Luisoni i Greber 2016). Neki adenovirusi grupe B (HAdV3, 7 i 14) ne koriste CD46 kao primarni receptor, već transmembranski glikoprotein desmoglein-2 (Wang i sur. 2010). Desmoglein-2 pripada obitelji kadherina te je uključen u održavanje stanične adhezije preko specifičnih proteinskih struktura, desmosoma (Stasiak i Stehle 2020). Zanimljivo, HAdV11

grupe B može koristiti i CD46 i desmoglein-2 kao receptor za vezanje na stanice (Wang i sur. 2010).

Receptori koje koriste adenovirusi grupe D slabo su istraženi. Pokazano je da se s različitim afinitetom mogu vezati na CAR te CD46 (Arnberg 2012). Nestić i sur. (2018) pokazali su da je za uspješnu infekciju epitelnih stanica virusom HAdV26 nužan integrin $\alpha\beta3$, dok je za HAdV37 pokazano da kao receptor koristi sijalinsku kiselinu (Arnberg 2002, Nilsson i sur. 2010). Sijalinska kiselina je monosaharid i derivat neuraminske kiseline te se nalazi na površini stanica vezana na glikoproteine (Stasiak i Stehle, 2020). Osim grupe D, pokazano je da i HAdV52 grupe G koristi sijalinsku kiselinu kao receptor (Luisoni i Greber, 2016).

Integrini su transmembranski proteini čija je uloga učvršćivanje stanica vezanjem na ekstracelularni matriks, prijenos signala, te sudjelovanje u staničnoj migraciji, proliferaciji i diferencijaciji (Nemerow 2009, Luisoni i Greber 2016). Kod ljudi raspoznamo 18 α podjedinica te 8 β podjedinica koje grade 24 heterodimerna intergina (Stasiak i Stehle 2020). Kod epitelnih stanica, intergini su lokalizirani bazolateralno i povezuju stanice za ekstracelularni matriks, no tijekom infekcije virusom mogu se translocirati na apikalnu površinu stanica (Arnberg 2012, Luisoni i Greber 2016). Pokazano je da se HAdV preko RGD motiva u bazi pentona mogu vezati na integrine $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ (Arnberg 2012). Vezanjem na integrine potiče se njihovo nakupljanje što okida signale za ulazak virusa HAdV u stanicu receptor-posredovanom endocitozom (Arnberg 2012). Za adenoviruse, kao što je HAdV5 koji koristi CAR kao primarni receptor, sekundarna interakcija s integrinima kao koreceptorima ključna je za okidanje signala i ulazak u stanicu (Leopold i Crystal, Wickham i sur. 1993).

1.3.2. Ulazak u stanice

Vezanje adenovirusa za receptore na staničnoj površini pokreće njihovu internalizaciju u stanice endocitozom. Endocitoza je proces unosa izvanstaničnih makromolekula i čestica te komponenata membrane, uključujući receptore te na njih vezane ligande, u stanice unutar vezikula nastalih uvrnućem stanične membrane. Za ulazak u stanice HAdV koriste nekoliko tipova endocitoze: endocitozu posredovana klatrinom koja je najbolje proučena, makropinocitozu, endocitozu posredovana kaveolinom te fagocitozu (Luisoni i Greber 2016, Meier i Greber 2004). Makropinocitoza je tip endocitoze u kojem se izvanstanični materijal, poput tekućina i dijelova membrane, unosi u stanice unutar makropinosoma, velikih

proteinima-neobloženih vakuola nastalih remodeliranjem stanične membrane (Luisoni i Greber 2016). Endocitozom posredovanom kaveolinom makromolekule ulaze u stanicu unutar kaveola, uvrnuća dijelova membrana bogatih sfingolipidima i kolesterolom koje gradi kaveolin-1, te ima važnu ulogu u staničnoj adheziji i rastu (Yousuf i sur. (2013). Općenito, fagocitozom se u stanicu unose krupnije čestice uglavnom u svrhu hranjenja, dok je fagocitoza virusa vezana uz imunosnu obranu domaćina. Imunoglobulini prepoznaju i vežu se za HAdV svojim varijabilnim domenama te interakcijom s Fc receptorima potiču njihovu fagocitozu u stanice imunosnog sustava gdje dolazi do neutralizacije adenovirusnih čestica te prezentacije antigena na površini stanica (Greber i Flatt 2016).

Meier i sur. (2002) su pokazali da HAdV2 ulazi u stanice endocitozom posredovanom klatrinom. Infekcija virusom HAdV2 također aktivira makropinocitozu koja nije primarni način ulaska virusa u stanicu, ali je usko povezana s bijegom virusa HAdV2 u citosol. Za HAdV3 i HAdV35 grupe B pokazano je da koriste makropinocitozu kao primaran način ulaska u stanice nakon vezanja za receptor CD46 i integrine (Kälin i sur. 2010, Amstutz i sur. 2008).

Za HAdV37 grupe D, jednog od uzročnika epidemijskog keratokonjunktivitisa u ljudi, pokazano je da koristi različite tipove endocitoze ovisno o tipu stanice koje inficira. Yousuf i sur. (2013) su pokazali da je ulazak virusa HAdV37 u primarne fibroblaste rožnice čovjeka ovisan o kaveolinu-1 i kolesterolu. S druge strane, nedavno je pokazano da u epitelne stanice rožnice HAdV37 ulazi posebnim tipom endocitoze posredovane klatrinom koji je neovisan o dinaminu (Lee i sur. 2020).

1.3.3. Endocitoza posredovana klatrinom

Endocitoza posredovana klatrinom je glavni način ulaska staničnih receptora i na njih specifično vezanih liganada u eukariotskim stanicama. Stanica se njome služi kako bi unosila hranjive tvari, regulirala sastav stanične membrane u odgovoru na okolišne uvjete te vršila prijenos signala putem receptora (McMahon i Boucrot 2011, Mettlen i sur. 2018). Mnogi virusi koriste ovaj tip endocitoze za ulazak u stanice (Mercer i sur. 2010).

Endocitoza posredovana klatrinom je visoko koordiniran proces u kojeg je uključeno preko 50 citosolnih proteina (McMahon i Boucrot 2011). Prvi korak endocitoze posredovane klatrinom je formiranje mjehurića obavijenog klatrinom što se odvija na specijalnim domenama membrane bogatima fosfatidilinozitol-4,5,-bifosfatom (eng. *phosphatidyl-inositol-4,5-*

bisphosphate, PI(4,5)P2). Nakon vezanja liganda za receptor, citosolni adapterski proteini, od kojih je glavni protein AP-2 (eng. *adapter protein-2*), prepoznaju motive za endocitozu u citoplazmatskoj regiji receptora te se istovremeno vežu za PI(4,5)P2 u membrani. Vezanje proteina AP-2 za receptor, u nastavku teret, i membranu potiče dolazak drugih citosolnih proteina uključenih u formiranje mjehurića obavljenog klatrinom (Mettlen i sur. 2018, Kaksonen i Roux 2017). Ključan protein u formiranju obloženih mjehurića je klatrin koji preko adapterskih proteina gradi mrežu s unutrašnje strane membrane. Osnovna građevna jedinica klatrina je triskelion koji se sastoji od tri teška i tri laka lanca na koje se vežu različiti adapterski i pomoćni proteini koji sudjeluju u endocitozi posredovanoj klatrinom (Kaksonen i Roux 2017, McMahon i Boucrot 2011). Osim klatrina, razni adapterski proteini su važni za oblikovanje mjehurića. Oni se mogu vezati na klatrin, membranu preko PI(4,5)P2, teret i međusobno te zajedno s pomoćnim i regulatornim proteinima sudjeluju u prepoznavanju tereta za unos, procesu invaginacije membrane te stabilizaciji same strukture mjehurića. Uz već spomenuti glavni adapterski protein AP-2, poznati su i drugi: Epsin (eng. *Eps15-interacting protein*) i AP180/CALM (eng. *clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein*) koji vežu klatrin te sudjeluju u savijanju membrane, Eps15 koji je važan za prepoznavanje receptora i tereta te mnogi drugi (Reider i Wendland 2011, Meier i Greber 2004). Nakon formiranja mjehurića obavljenog klatrinom unutar kojeg se nalazi teret mora doći do njegovog odvajanja od membrane i otpuštanja u citosol. Dinamin je GTP-aza koja se veže za netom formiran mjehurić i odvaja ga od membrane. Tako otpušteni mjehurić s teretom brzo gubi svoj klatrinski omotač te dalje putuje prema različitim odredištima u stanici gdje se sortira (McMahon i Boucart 2011).

U ranijim studijama u kojima je elektronskom mikroskopijom proučavan tijek infekcije virusima HAdV2 i HAdV5, uočen je ulazak virusa unutar obloženih vezikula za koje se smatralo da su obložene klatrinom (Svensson 1985, Luisoni i Greber 2016). Korištenjem dominantno negativnih varijanti proteina klatrina, dinamina i Eps15, koji inhibiraju ulazak i putovanje adenovirusnih čestica do jezgre, potvrđeno je da HAdV2 i HAdV5 ulaze u epitelne stanice endocitozom posredovanom klatrinom i ovisnom o dinaminu (Meier i sur. 2002, Wang i sur. 2002).

1.3.4. Izlazak iz endosoma i putovanje do jezgre

Za uspješnu infekciju, nakon ulaska u stanicu, HAdV mora doputovati do jezgre i dostaviti svoj genetički materijal. Nakon ulaska endocitozom, adenovirusi se nalaze u endosomima iz

kojih moraju izaći kako bi nastavili putovanje prema jezgri (Greber i Flatt 2019). Iako je izlazak iz endosoma ključan korak u replikativnom ciklusu adenovirusa, o njemu se još uvijek malo zna, a većina saznanja dobivena je istraživanjem adenovirusa grupe C, HAdV2 i HAdV5 (Leopold i Crystal 2007). Wiethoff i sur. (2005) su pokazali da je za bijeg adenovirusa u citosol zaslužan protein VI koji lizira membranu endosoma. Tijekom ulaska u stanicu i putovanja kroz citoplazmu struktura adenovirusne čestice se mijenja, gubi se protein vlakna, a posljedično se protein VI izlaže na površinu kapside (Greber i sur. 1993, Greber i Flatt 2019). Prijašnja su istraživanja pokazala da tijekom sazrijevanja endosoma postoji ovisnost niskog pH i adenovirusnog bijega iz endosoma (Leopold i Crystal 2007), međutim novija istraživanja pokazuju da za izlazak virusa HAdV iz endosoma nije potreban nizak pH (Suomalainen i sur. 2013). Tome u prilog idu i saznanja da do gubitka vlakna i izlaganja proteina VI dolazi već na staničnoj membrani uslijed vezanja virusa za receptore te da je sama litička aktivnost proteina VI neovisna o pH (Wiethoff i sur. 2005, Suomalainen i sur. 2013, Burchard i sur. 2011).

Nakon bijega iz endosoma, djelomično rastavljena adenovirusna čestica nalazi se u viskoznoj citoplazmi punoj različitih staničnih dijelova što joj onemogućava pasivnu difuziju do jezgre (Leopold i Crystal 2007), stoga se veže za motorni protein dinein te putuju mikrotubulima prema jezgri (Leopold i sur. 2000). Dinein je protein koji prenosi HAdV prema minus kraju mikrotubula, odnosno prema središtu organizacije mikrotubula (eng. *microtubule organizing center*, MTOC) koji se kod većine stanica nalazi u perinuklearnom području (Luisoni i Greber 2016). Vezanje dineina i virusa HAdV ostvaruju se preko heksona kapside (Bremner i sur. 2009) koji prije toga prolazi kroz konformacijske promjene (Scherer i Vallee 2015). U perinuklearnom području adenovirusne čestice odvajaju se od mikrotubula, vežu za proteine jezgre i unose svoj genetički materijal, no detaljan mehanizam odvajanja još nije poznat (Leopold i Crystal 2007).

1.3.5. Unos genoma u jezgru te nastanak novih virusnih čestica

Dolaskom u perinuklearno područje, djelomično rastavljena adenovirusna čestica veže se za kompleks jezgrine pore (eng. *nuclear pore complex*, NPC), kanal koji regulira prolazak tvari kroz jezgrinu ovojnicu. Budući da kroz NPC mogu proći molekule veličine do 40 nm, u jezgru se ubacuje samo adenovirusni genom vezan s proteinima srži (Luisoni i Greber 2016, Greber i Flatt 2016). Adenovirusna čestica se heksonom veže za Nup214, nukleoporin NPC-a, dok se proteinom IX veže za laki lanac motornog proteina kinezin-1. Kinezin-1 se istovremeno teškim

lancem veže za druge nukleoporine NPC-a i gibanjem prema plus kraju mikrotubula nastaje mehanička sila koja uzrokuje razdvajanje proteina kapside i oslobađanje adenovirusnog genoma. Također, dolazi do narušavanja stabilnosti NPC-a istiskivanjem određenih nukleoporina u citosol čime se poveća propusnost jezgrine ovojnice i tako omogućuje ulazak adenovirusnog genoma (Strunze i sur. 2011). Ulaskom u jezgru genetički materijal virusa se ne ugrađuje u genom domaćina već ostaje episomalno te dolazi do njegove transkripcije i replikacije (vidi poglavlje 1.2.), sinteze proteina, a potom i slaganje novih virusnih čestica unutar jezgre te njihovog izlaska iz zaražene stanice domaćina (Gonçalves i de Vries 2006).

1.4. Imunosni odgovor i prijenos signala potaknut ulaskom adenovirusa u stanicu

Ulaskom adenovirusa u stanicu dolazi do aktivacije različitih signalnih puteva koji aktiviraju specifičan odgovor stanice na infekciju. Ti odgovori uključuju promjene u staničnom metabolizmu, transportu tvari i ekspresiji određenih gena koje HAdV iskorištava kako bi ušao u stanice i dostavio svoj genom, ali također sudjeluju u obrani stanice od infekcije. Prijenos signala započinje vezanjem virusa HAdV za stanične receptore koji preko adapterskih i signalnih molekula aktiviraju signalnu kaskadu koja rezultira specifičnim odgovorom stanice na ulazak adenovirusa (Greber 2002).

Za ulazak adenovirusa u stanice endocitozom posredovanom klatrinom važni su integrini. Vezanjem baze pentona virusa HAdV na integrine potiče se njihovo nakupljanje (eng. *clustering*) te aktivacija uslijed čega dolazi do prijenosa signala važnog za formiranje mjehurića obloženog klatrinom (Nemreow i Stuart 1999) pomoću Rho obitelji malih GTP-aza (Li i sur. 1998). Aktivirane Rho GTP-aze potiču polimerizaciju aktinskih filamenata koji mehaničkim silama pomažu u oblikovanju membrane te tako sudjeluju u formiranju mjehurića obloženih klatrinom i njihovom odvajanju od membrane (Nemreow i Stuart 1999, Yarar i sur. 2005, Luisosni i Greber 2016).

Prva linija obrane od infekcije adenovirusom je urođeni imunosni odgovor stanice posredovan raznim citokinima i kemokinima. To su molekule koje uzorkuju stanične promjene kojima se sprječava replikacija virusa, potiču upalno stanje i na mjesto infekcije privlače imunosne stanice koje sprječavaju širenje zaraze uklanjanjem inficiranih stanica, te također sudjeluju u poticanju specifičnog adaptivnog imunosnog odgovora na virus (Hendrix i sur. 2014, Muruve 2004, Abbas i sur. 2018). Za pokretanje urođenog imunosnog odgovora ključno je prepoznavanje virusa HAdV putem specifičnih receptora PRR (eng. *pathogen recognition*

receptors). Receptori PRR prepoznaju različite dijelove virusa HAdV, kao što su kapsida i DNA, a njihova lokalizacija u stanici omogućava prepoznavanje virusa HAdV tijekom svih faza replikativnog ciklusa: na staničnoj površini tijekom vezanja za receptore i ulaska u stanicu, tijekom putovanja u endosomima te nakon bijega virusa u citosolu (Hendrix i sur. 2014, Muruve 2004). Najpoznatiji PRR koji prepoznaju HAdV su: receptori slični Tollu (eng. *Toll-like receptors*, TLR), citosolni receptori slični NOD-u (eng. *NOD-like receptors*, NLR) koji su sastavni dijelovi inflammasoma, proteinskog kompleksa koji potiče upalu, te citosolni senzori koji prepoznaju DNA, cGAS i DDX44 (Hendrix i sur. 2014). Najbolje proučeni PRR su TLR, obitelj transmembranskih receptora izraženi na različitim imunskim i ne-imunskim stanicama (Takeuchi i Akira 2010). U ljudi je identificirano 10 različitih tipova receptora TLR koji se razlikuju ovisno o smještaju u stanici i ligandu, odnosno dijelu patogena, kojeg prepoznaju. TLR koji se nalaze na površini stanice (TLR1, 2, 4, 5 i 6) prepoznaju komponente bakterija i gljiva dok oni koji se nalaze u membrani endosoma (TLR3, 7, 8 i 9) prepoznaju različite dijelove nukleinskih kiselina karakterističnih za mikroorganizme, ali ne i za sisavce (El-Zayat i sur. 2019, De Nardo 2015, Balka i De Nardo 2018). Za pokretanje imunskog odgovora uslijed ulaska virusa HAdV važan je TLR9 koji prepoznaje nemetiliranu CpG-bogatu DNA (Iacobelli -Martinez i Nemerow 2007, Cerullo 2007, Yamaguchi i sur. 2007). Nakon prepoznavanja virusa HAdV na aktivirane receptore TLR vežu se adaptorski proteini od kojih su najvažniji MyD88 (eng. *myeloid differentiation factor 88*) i TRIF (eng. *TIR-domain containing adaptor molecule*). Oni potom aktiviraju različite signalne puteve kojima je cilj aktivacija transkripcijskih faktora IRF3 i IRF7 (eng. *interferon response factor 3 and 7*), NFκB (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) te AP-1 (eng. *activation protein-1*). IRF3 i IRF7 potiču ekspresiju interferona tipa I (eng. *interferon type I*, IFN-I), velike obitelji citokina od kojih su za virusnu obranu najvažniji IFN-α i IFN-β. NFκB i AP-1 potiču ekspresiju gena mnogih pro-upalnih citokina, kao što su TNF-α (eng. *tumor necrosis factor alpha*), interleukin 6 (IL-6) i interleukin 1 (IL-1) te kemokine koji privlače imunske stanice na mjesto upale, kao što je interleukin 8 (IL-8) i interleukin 4 (eng. *C-C motif ligand 4*; CCX4) (El-Zayat i sur. 2019, Balka i De Nardo 2018, Hendrix i sur. 2014). Infekcija virusom HAdV potiče složen imunski odgovor stanice tijekom kojeg dolazi do aktivacije mnogih signalnih puteva koji se međusobno isprepliću. Trenutno su poznate neke molekule koje u njima sudjeluju poput proteina MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*). MAPK su obitelj proteinskih kinaza specifičnih za serin i treonin aminokiseline koje sudjeluju u mnogim signalnim putevima koji reguliraju ekspresiju gena, mitozu, metabolizam, preživljavanje, diferencijaciju i smrt stanice u odgovor na različite vanstanične podražaje. Najbolje proučene MAP kinaze su ERK

(eng. *extracellular signal-regulated kinase*), p38 te JNK (eng. *c-Jun amino (N)-terminal kinase*) (Cargnello i Roux, 2011). Pokazano je da infekcija virusom HAdV potiče aktivaciju MAP kinaza ERK i p38 te da su one uključene u signalne puteve koji dovode do ekspresije upalnih citokina i kemokina (Tibbles i sur. 2001). Također je pokazano da aktivacija ovih MAP kinaza dovodi i do aktivacije transkripcijskog faktora NFkB koji inducira ekspresiju gena mnogih citokina (Rajaiya i sur. 2008).

1.5. Adenovirus tipa 26 (HAdV26)

Kao što je na početku navedeno (poglavlje 1.1), visoka seroprevalencija nekih virusa HAdV ograničava njihovo korištenje kao vektora u genskoj terapiji i vakcinaciji zbog čega istraživanja idu u smjeru niskoseroprevalentnih virusa HAdV kao što je HAdV26 (Abbink i sur. 2007, Barouch i sur. 2011). U istraživanju provedenom na ispitanicima iz različitih dijelova svijeta, uključujući dijelove Europe, SAD-a, Afrike, Brazila i Tajlanda, Mast i sur. (2010) su pokazali da je 42 % ljudi negativno na HAdV26 neutralizacijska antitijela u usporedbi s 14,8 % na neutralizacijska antitijela virusa HAdV5. Osim niske seroprevalencije, istraživanja su pokazala da HAdV26 izaziva snažan imunosni odgovor zbog čega je prepoznat kao izvrstan kandidat za razvoj cjepiva (Abbink i sur. 2007). Predkliničke studije na laboratorijskim životinjama i kliničke studije na ljudima pokazale su da cjepiva temeljena na vektorima HAdV26 potiču širok i raznolik antigen-specifičan humoralni i stanični imunosni odgovor (Khan i sur. 2017, Cox i sur. 2018, Baden i sur. 2015, Geisbert i sur. 2011, Chen i sur. 2010). Imunosni odgovor ljudi na cjepiva temeljena na vektoru HAdV26 nije bio smanjen unatoč postojanju neutralizacijskih antitijela prema virusu HAdV5 (Geisbert i sur. 2011). Dodatno, Teigler i sur. (2012) su pokazali da HAdV26 u odnosu na HAdV5 potiče značajniji urođeni imunološki odgovor karakteriziran upalnim i antivirusnim citokinima i kemokinima što može dodatno stimulirati i pojačati specifičan imunosni odgovor na cjepiva temeljena na virusu HAdV26.

HAdV26 pripada grupi D, najbrojnijoj grupi ljudskih adenovirusa koji mogu uzrokovati infekcije oka, uključujući i najčešće uzročnike epidemijskog keratokonjunktivitisa kao što je HAdV37, te infekcije gastrointestinalnog sustava (Baker i sur. 2019, Lee i sur. 2017). HAdV26 je otkriven 1961. godine uslijed izolacije iz stolice djeteta (Rosen i sur. 1961). Inokulacijom u oko ovaj virus uzrokuje akutni konjunktivitis (Kasel i sur. 1963), međutim, njegov prirodni tropizam još uvijek nije poznat. Struktura čestice virusa HAdV26 određena je 2017. godine

krioelektronskom mikroskopijom (Yu i sur. 2017) te iako pripada drugoj grupi, sveukupna struktura i organizacija čestice ne razlikuje se previše od virusa HAdV5. Jedna od razlika između ova dva serotipa adenovirusa je duljina vlakna pri čemu HAdV26 ima kraće vlakno sa samo 8 β -ponavljanja u odnosu na 22 β -ponavljanja koja ima vlakno virusa HAdV5.

O samom replikativnom ciklusu, i općenito osnovnoj biologiji, virusa HAdV26 se relativno malo zna. Kao i za druge adenoviruse grupe D (poglavlje 1.3.1), pokazano je da se HAdV26 može vezati za razne receptore na staničnoj površini. Korištenjem epitelnih stanica *de novo* eksprimiranim receptorom CAR ili CD46, Abbink i sur. (2007) su pokazali da HAdV26 može koristiti CD46 kao receptor ali se za njega veže slabijim afinitetom od adenovirusa grupe B. Uključenost CD46 pokazana je i za ulazak virusa HAdV26 u periferne stanice krvi (Li i sur. 2012). HAdV26 se može vezati za CAR na površini epitelnih stanica, ali slabijim afinitetom u odnosu na HAdV5 (Chen i sur. 2010). Također, pokazano je da vlakno virusa HAdV26 uspostavlja stabilnu interakciju sa sijalinskom kiselinom što upućuje da bi HAdV26 mogao koristiti i sijalinsku kiselinu kao receptor (Baker i sur. 2019). Sva ova saznanja upućuju na to da HAdV26 koristi neki drugi, alternativni receptor za ulazak u stanice. Nedavno su Nestić i sur. (2019) pokazali da je za uspješnu infekciju epitelnih stanica virusom HAdV26 potreban integrin $\alpha\beta3$. Dodatno, korištenjem klonova epitelnih stanica koji imaju povećanu ekspresiju integrina $\alpha\beta3$ pokazano je da povećana ekspresija integrina $\alpha\beta3$ povećava internalizaciju virusa HAdV26 u stanice, međutim, način ulaska kao i tip endocitoze kojom HAdV26 ulazi u stanice nije opisan.

Trenutno se cjepiva temeljena na vektorima HAdV26 nalaze u oko 30 kliničkih studija (<https://clinicaltrials.gov/>), što uključuje cjepiva protiv HIV-a (virus imunodeficiencije čovjeka, eng. *Human Immunodeficiency Virus*), Zika virusa, malarije i HPV-a (eng. *Human Papilloma Virus*). *Zabdeno*, cjepivo protiv Ebole, je prvo cjepivo temeljeno na vektoru HAdV26 odobreno za upotrebu u Europskoj Uniji od strane agencije EMA (eng. *European Medicines Agency*; <https://www.ema.europa.eu/en>). Važnost HAdV26 kao vektora za razvoj cjepiva dodatno potvrđuje činjenica da se za virus SARS-CoV-2, koji se od pojavljivanja krajem 2019. proširio diljem svijeta te uzrokovao pandemiju, razvija nekoliko cjepiva temeljena na vektorima HAdV26 od kojih su dva odobrena za upotrebu – cjepivo *Janssen* tvrtke Johnson & Johnson te rusko cjepivo *Sputnik V*, koje se temelji na kombinaciji vektora HAdV5 i 26 (EMA-<https://www.ema.europa.eu/en>, <https://covid19.who.int/>).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Imunogenost virusa HAdV26 u *in vivo* uvjetima prilično je dobro opisana, no osnovna biologija ovog virusa je još uvijek nedovoljno istražena. Trenutno ne postoje studije koje opisuju urođeni imunosni odgovor izazvan infekcijom epitelnih stanica virusom HAdV26 niti način na koji ovaj virus ulazi u stanice. Preliminarni rezultati dobiveni u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković, gdje je rađen ovaj diplomski rad, pokazali su da inhibicija endocitoze posredovane klatrinom, korištenjem inhibitora *Pitstop 2*, zaustavlja HAdV26 ispod membrane stanice i onemogućava njegovo unutarstanično putovanje. Inhibicija *Pitstopom 2* ujedno povećava vezanje i ulazak virusa, pri čemu se ne mijenja ekspresija integrina $\alpha\beta3$ na površini stanica.

Cilj ovog rada je istražiti kako endocitoza posredovana klatrinom utječe na ekspresiju upalnih citokina nakon infekcije epitelnih stanica virusom HAdV26. Pokusi će se provoditi na staničnim linijama A549 i njenom klonu A549-E6 koji ima povećanu ekspresiju integrina $\alpha\beta3$. Nakon inhibicije endocitoze *Pitstopom 2* i infekcije stanica odrediti će se ekspresija gena koji kodiraju za najčešće citokine potaknute infekcijom adenovirusima. Također će se ispitati utjecaj inhibicije endocitoze na količinu izlučenih citokina potaknutih infekcijom virusom HAdV26. S obzirom da je poznato da infekcija adenovirusima potiče aktivaciju prijenosa signala MAPK, u ovom radu će se ispitati i utječe li te na koji način inhibicija endocitoze posredovane klatrinom na prijenos signala posredovan MAP kinazama nakon infekcije virusom HAdV26.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

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

Tablica 1. Osnovne kemikalije korištene u radu

Kemikalije	Proizvođač	Kemikalija	Proizvođač
agaroza	Sigma-Aldrich, Njemačka	akrilamid	Sigma-Aldrich, Njemačka
amidocrno (eng. <i>amido black</i>)	Kemika, Hrvatska	amonijev persulfat, APS	Serva, Njemačka
beta-merkaptotanol	Fluka, Njemačka	bisakrilamid	Serva, Njemačka
bromfenolno plavilo (eng. <i>bromophenol blue</i>)	Serva, Njemačka	cezijev klorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, Njemačka
deionizirana voda (diH ₂ O)	-	DMSO (dimetilsulfoksid)	Sigma-Aldrich, Njemačka
DMEM, Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (eng. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	Sigma-Aldrich, Njemačka	DPBS (eng. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>), fosfatni pufer bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, SAD
etanol	GramMol, Hrvatska	<i>Midori Green</i> , boja za agarozni gel	NIPPON Genetics EUROPE, Njemačka
<i>Mili-QH₂O</i>	Lonza, Švicarska	glicerol	Kemika, Hrvatska
mlijeko u prahu, nemasno	Carl Roth, Njemačka	<i>Orange G</i> , boja za RNA	Merck Milipore, Njemačka
<i>Pierce ECL Westernska analizating Substrate</i> , kemiluminiscentni reagens za Westernska analiza analizu	Thermo Fisher Scientific, SAD	<i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i> , mješavina reagensa za reakciju PCR	Applied Biosystems, SAD
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i> , proteinski marker za SDS-elektroforezu	Thermo Scientific, SAD	reH ₂ O	-
SDS (natrij-dodecil sulfat)	Sigma-Aldrich, Njemačka	serum fetusa goveda (eng. <i>Fetal Bovine Serum</i> ; FBS)	Sigma-Aldrich, SAD

Nastavak **Tablice 1.**

standard za elektoroforezu u gelu	Thermo Fisher Scientific, SAD	TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilendiamin)	Sigma-Aldrich, SAD
tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Njemačka	tris baza	Sigma-Aldrich, SAD
Tris-HCl	Merck Millipore, Njemačka	Tween-20	Sigma-Aldrich, Njemačka

Tablica 2. Korištene otopine i puferi te njihova priprema

Naziv	Priprema
Amidocrno boja 0,1 %	45 mL metanola, 10 mL octene kiseline, 45 mL vode, 0,1 g amido black otopine
50 X pufer TAE	242 g Tris baza, 57,1 mL ledene octene kiseline, 100mL 0,5 M, pH 8.0, otopiti u 1 L diH ₂ O
10 X TBS	500 mL Tris-HCl (pH 7,5), 300 mL 5 M NaCl, 200mL diH ₂ O, čuva se pri 4 °C
6 X SB pufer (eng. <i>sample buffer</i> ; za SDS-PAGE)	1.2 g SDS otopi se u 2 mL diH ₂ O, doda se 2.5 mL 1.5M Tris-HCl (pH 6.8) i 30 mg bromfenol plavila, nakon što se otopi doda se 3 mL glicerola i 1.2 mL β-merkaptotetanol. Dopuni se do 10 mL diH ₂ O i čuva pri –20 °C
akrilamid/bisakrilamid miks 30 %	29,2 g akrilamida i 0.8 g bisakrilamida otopi se u 100mL diH ₂ O
APS, 10 %	500 mg APS-a otapa se u 5 mL diH ₂ O, čuva se pri –20°C
DMEM-FBS (0.2 %)	10 mL FBS u 5000 mL DMEM
DMEM-FBS (10 %)	500 mL FBS u 5000 mL DMEM
otopina CsCl gustoće 1,25 g mL ⁻¹	36,16 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
otopina CsCl gustoće 1,34 g mL ⁻¹	51,20 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
otopina CsCl gustoće 1,40 g mL ⁻¹	62,00 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera
otopina za odbojavanje	40 mL metanola, 7 mL octene kiseline, 53 mL vode
pufer PS	10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS u diH ₂ O
pufer TBST	50 mL pufera 10x TBS, 450 mL diH ₂ O, 450 µL Tween-20
pufer TD	8 g NaCl i 0.38 g KCl otopi se u 150 mL diH ₂ O, doda se 0.1g Na ₂ HPO ₄ i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH ₂ O, podesi pH 7.4-7.5, nadopuni do 1 L s diH ₂ O; sterilizira se autoklavanjem
pufer Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	6 g Tris-HCl otopi se u 80 mL diH ₂ O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, nadopuni se diH ₂ O do 100mL, čuva se pri 4°C
pufer Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M)	18.2 g Tris-HCl otopi se u 100 mL diH ₂ O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, čuva se pri 4°C

Nastavak **Tablice 2.**

pufer za uklanjanje vezanih protutijela za membranu (eng. <i>stripping bufferr</i>)	100 mM otopina glicina u diH ₂ O, pH 2,8
transfer pufer	50 ml Tris-glicinski pufer pH 8,3, 350 ml diH ₂ O, 100ml etanol

3.1.2. Kompleti kemikalija

U ovom su radu koristila sam slijedeće komplete kemikalija:

- komplet za izolaciju RNA - *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche, SAD)
- komplet za reverznu transkripciju RNA u cDNA - *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, SAD)
- komplete za ELISA reakciju - *Human IL-6 Uncoated ELISA* (Invitrogen, SAD) i *Human IL-8 Uncoated ELISA* (Invitrogen, SAD)

3.1.3. Kemijski inhibitor endocitoze posredovane klatrinom

Za kemijsku inhibiciju endocitoze posredovane klatrinom koristila sam spoj *Pitstop 2* (Abcam, UK). *Pitstop 2* se veže za domene teškog lanca klatrina zbog čega sprječava interakciju s adaptorskim i pomoćnim proteinima u stanici te mu onemogućava vezanje za formirani endocitozni mjehurić (Von Kleist i sur. 2011). Otapanjem liofiliziranog inhibitora u DMSO pripremljena je otopina koncentracije 30 mM koja se čuva pri -20 °C. Finalnu radnu koncentraciju od 20 µM pripremila sam otapanjem u hranjivoj podlozi DMEM-FBS (0.2 %) netom prije korištenja.

3.1.4. Početnice

Korištene početnice navedene su u Tablici 3. Otopine početnica koncentracije 100 µM pripremljene su otapanjem liofiliziranih početnica u *Mili-QH₂O*. Daljnjim razrjeđivanjem u *Mili-QH₂O* pripremljene su radne otopine početnica konačne koncentracije od 10 µM. Otopine početnica su čuvane pri -20 °C.

Tablica 3. Popis korištenih početnica

Početnice za gen	Slijed nukleotida u smjeru 5' – 3'
GAPDH	F: AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG R: TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA
IL-6	F: CAATGAGGAGACTTGCCTGG R: GCACAGCTCTGGCTTGTTC
IL-8	F: GTTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTC R: ATGAAGTGTTGAAGTAGATTTGCTTG
IFN- α	F: ACCCACAGCCTGGATAACAG R: CTCTCCTCCTGCATCACACA

3.1.5. Protutijela

Popis protutijela korištenih u westernskoj analizi nalazi se u Tablici 4. Navedena razrjeđenja protutijela pripremila sam u 5 %-tnom mlijeku u puferu TBST. Tako pripremljena primarna protutijela se čuvaju pri -20 °C, dok se razrijeđena sekundarna protutijela čuvaju pri +4 °C.

Tablica 4. Korištena protutijela

Specifičnost protutijela	Proizvedeno u organizmu	Razrjeđenje	Proizvođač
PRIMARNA PROTUTIJELA			
pNFkB	zec	1:1000	Cell Signaling, SAD
NFkB	miš	1:1000	Cell Signaling, SAD
pERK	miš	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD
ERK	zec	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD
pp38	miš	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD
p38	zec	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD
SEKUNDARNA PROTUTIJELA			
anti-miš imunoglobulini, obilježeni peroskidazom hrena	ovca	1:10 000	GE Healthcare, SAD
anti-zec imunoglobulini, obilježeni peroskidazom hrena	koza	1:5000	Thermo Fischer Scientific, SAD

3.1.6. Stanične linije

U ovom radu koristila sam adherentne stanice bubrega embrija čovjeka HEK-293 (eng. *human embryonic kidney 293 cells*, ATCC® CRL-1573TM), stanice adenokarcinoma pluća čovjeka A549 (eng. *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*, ATCC® CCL-185) te pripadajući klon A549-E6 uspješno transficiran plazmidom koji kodira za integrin α_v , prethodno konstruiran u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala (Nestić i sur. 2019).

3.1.7. Adenovirusi

U radu sam koristila prethodno konstruiran replikacijski defektan adenovirus HAdV26 koji eksprimira transgen eGFP (eng. *green fluorescent protein*) pod regulacijom CMV promotora (Abbink i sur. 2007). Replikacijski defektan HAdV26 umnožila sam u komplementirajućim stanicama HEK-293 te potom pročistila ultracentrifugiranjem u gradijentu cezijeva klorida.

3.1.8. Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali

U Tablici 5. navedeni su korišteni uređaji, a u Tablici 6. laboratorijski pribor.

Tablica 5. Korišteni uređaji

Uređaj	Proizvođač
analitička vaga AB54-S	Mettler Toledo Classic
brojač stanica <i>Coulter Counter</i>	Beckman Coulter, SAD
centrifuga za mikroeprevute (do $14000 \times g$)	Eppendorf, Njemačka
inkubator za uzgoj stanica <i>HeraCell 150</i>	Heraeus, Njemačka
izvor napajanja za elektroforezu proteina i transfer <i>PowerPac Basic</i>	BioRad, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
kupelj <i>JB Nova</i>	Grant Instruments, UK
spektrofotometar <i>Nanodrop</i>	Thermo Fischer Scientific, SAD
spektrofotometar <i>StatFax 2100</i>	Awareness Technology INC, SAD
sustav za vertikalnu elektroforezu	Bio-Rad, Njemačka
svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
termoblok <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf, Njemačka
ultracentrifuga <i>Optima XL-100K</i>	Beckman, SAD
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom <i>Ultrasonic Processor</i>	Cole Palmer, SAD
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala <i>ChemiDoc Imaging System</i>	BioRad, SAD
uređaj za kvantitativni PCR <i>StepOnePlus™ Real-Time PCR System</i>	Thermo Fischer Scientific, SAD
uređaj za RT PCR <i>Eppendorf 5345 Eppgradient S Mastercycler</i>	Eppendorf, Njemačka
vodena kupelj	Tehtnica, Slovenija
vrtiložna mješalica EV 102	Tehtnica, Slovenija
zibalica <i>Vibromix 314 EVT</i>	Tehtnica, Slovenija

Tablica 6. Laboratorijski pribor korišten u radu

Laboratorijski pribor	Proizvođač
ampule za smrzavanje stanica	Nunc, Danska
aparatura za izlivanje gela i za vertikalnu elektroforezu proteina <i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems</i>	BioRad, SAD
epruvete za centrifugiranje <i>Ultra-Clear 344059</i>	Beckman, SAD
Erlenmeyer staklene tikvice različitih zapremina	VWR, SAD
Falcon epruvete različitih zapremina	Falcon Becton Dickinson, SAD
Hamilton igla	Hamilton, Švicarska
kadica za elektroforezu i transfer proteina	BioRad, SAD
kadica za gel elektroforezu	BioRad, SAD
kolona <i>Sephadex G25M</i>	GE Healthcare Life Sciences, Velika Britanija
mikroepruvete	Eppendorf, Njemačka
mikropipete	Eppendorf, Njemačka
nastavci za mikropipete s filtrom i bez filtra	Eppendorf, Njemačka
nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Amersham Pharmacia Biotech, Švedska
Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm	Falcon, SAD
pipete, plastične, različitih zapremina	Sigma-Aldrich, SAD
pipete, staklene, različitih zapremina	Bellco, SAD i Hirschmann, Njemačka
pločice za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD

3.1.9. Računalni programi

U ovom radu koristila sam slijedeće računalne programe:

- *Excel* (Microsoft Office, SAD)
- *GraphPad Prism 9* (GraphPad Software, SAD)
- *Image J* (National Institutes of Health, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Kultura stanica

Sve stanične linije korištene u ovom radu su adherentnog tipa što znači da rastu pričvršćene za dno posude. Stanice sam uzgajala u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm u tekućem

hranjivom mediju DMEM-FBS (10 %) prema preporukama ATCC (eng. *American Type Culture Collection*). Stanice sam uzgajala u inkubatoru za uzgoj kulture stanica u kojem se održavaju optimalni uvjeti za rast stanica - temperatura zraka od 37 °C uz 5 %-tni udio CO₂ u smjesi zraka.

Korištenjem svjetlosnog mikroskopa pratila sam konfluentnost stanica, odnosno popunjenost podloge, kako bi se stanice presadile u optimalnom trenutku prije nego prerastu dostupnu površinu za rast ili iscrpe dostupne hranjive sastojke. Presađivanje sam radila dva do tri puta tjedno, odnosno kada je konfluentnost stanica bila između 60-80 %. Stanice su presađivane na način da sam prvo uklonila hranjivu podlogu, nakon čega je slijedilo ispiranje puferom DPBS. Stanice sam potom odvojila od podloge dodatkom 1 mL tripsina zagrijanog na 37 °C. Nakon što sam pod svjetlosnim mikroskopom uočila odvajanje stanica od podloge, djelovanje tripsina zaustavljeno je dodatkom dva puta veće količine hranjivog medija te sam stanice resuspendirala i nasadila u nove posude za uzgoj stanica. Koncentraciju stanica za nasadivanje određivala sam pomoću uređaja za brojanje stanica. Kako bi se održala zaliha stanica, prema potrebi je dio stanica zamrzavan u tekući dušik. Odignutu suspenziju stanica sam centrifugirala (10 min pri 1000 x g), uklonila sam supernatant, a talog stanica resuspendirala u hranjivom mediju s dodanih 5 % DMSO. Suspenziju stanica prebacila sam u ampulu za zamrzavanje pri čemu sam je prvo stavila na led, a nakon 30 min prebacila na prsten spremnika s tekućim dušikom gdje se stanice smrzavaju u parama tekućeg dušika. Sljedeći dan ampule su stavljene u tekući dušik pri -196 °C gdje su čuvane do daljnjega.

Ovisno o potrebi, stanice sam odmrzavala uranjanjem ampule u vodenu kupelj zagrijanu pri 37 °C, nakon čega sam ih resuspendirala u hranjivom mediju prethodno zagrijanom na 37 °C, a zatim prebacila u novu posudu za uzgoj stanica. 24 h nakon odmrzavanja, stanicama sam promijenila medij kako bi se iz njega uklonio DMSO koji može imati toksično djelovanje na stanice.

3.2.2. Umnažanje i pročišćavanje replikacijski defektnog virusa centrifugiranjem u cezijevoj kloridu (CsCl)

Za umnažanje replikacijski defektnog virusa HAdV26 koristila sam komplementirajuće stanice HEK-293 koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenovirusnog genoma. HEK-293 stanice namnožila sam u 120 Petrijevih zdjelica te inficirala suspenzijom replikacijski defektnog virusa HAdV26 tako da je multiplicitet infekcije 5-10 PFU (eng. *plaque*

forming unit) po stanici. Inficirane stanice sam potom stavila u inkubator za uzgoj kulture stanica do trenutka kada je bio vidljiv potpuni citopatogeni efekt koji obično slijedi 48 do 72 h nakon infekcije. Infekciju sam pratila vizualno na sustavu EVOS *Cell Imaging*.

Nakon uočenog citopatogenog efekta, stanice sam odvojila od podloge laganim ispiranjem podloge na kojoj rastu stanice s hranjivim medijem, skupila ih u Falcon epruvetu te su stanice potom centrifugirane (10 min pri 1100 x g). Ukupni talog stanica sam resuspendirala u 10 mL medija DMEM-FBS (10 %) i nakon toga tri puta ponovila naizmjenično smrzavanje i zagrijavanje (prvo sam talog stanica smrznula na -80 °C, a potom zagrijala do 37 °C) kako bi se izazvala liza stanica i kako bi se oslobodile virusne čestice iz stanica. Centrifugiranjem su (10 min pri 3600 x g) odvojeni grubi raspadnuti ostaci stanica (talog) i oslobođene virusne čestice (supernatant). Virusne čestice iz supernatanta sam dalje pročišćavala u dva koraka: prvo na jastučiću cezijeveog klorida (CsCl), a potom u gradijentu CsCl. U prvom koraku pročišćavanja u epruvetu za ultracentrifugiranje dodala sam 2,4 mL CsCl (gustoće 1,4 g/mL) i obilježila nivo CsCl. Na njega sam pažljivo uz stijenkku nadslojila 2,4 mL CsCl (gustoće 1,25 g/mL) kako ne bi došlo do miješanja slojeva. Na nadslojene otopine cezijeva klorida dodala sam supernatant lizata stanica s oslobođenim virusnim česticama, a potom do vrha epruvete medij DMEM-FBS (10 %). Uzorke sam zatim centrifugirala u ultracentrifugi tijekom 1 h i 45 min (20 °C; 60 000 x g). Nakon centrifugiranja sloj virusnih čestica nalik je bijeloj vrpici i vidljiv na granici između dva sloja CsCl, a iznad tog sloja vidljiva je druga zona u kojoj se nalaze virusne čestice koje nisu potpuno formirane, primjerice virusi čije kapside su prazne. Pomoću šprice s iglom pažljivo sam pokupila sloj virusnih čestica u volumenu do 1,5 mL. U drugom koraku pročišćavanja, u novoj epruveti za ultracentrifugiranje, pokupljen volumen suspenzije virusnih čestica pomiješala sam s CsCl (gustoće 1,34 g/mL) do vrha epruvete. Uzorke sam potom centrifugirala u ultracentrifugi preko noći pri 20 °C i 60 000 x g. Tijekom centrifugiranja, virusne čestice prolaze kroz centrifugiranjem stvoreni gradijent CsCl te se zaustavljaju tamo gdje je gustoća CsCl jednaka gustoći virusnih čestica. Nakon centrifugiranja sam virusne čestice, vidljive kao oštar bijeli sloj, pomoću šprice s iglom skupila u što manjem volumenu, a potom uklonila CsCl tehnikom gel-filtracije pomoću kolone *Sephadex G-25M* (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Koloni pričvršćenoj na stalak odrezala sam vrh, a potom odčepila s gornje strane kako bi tekućina sama iscurila. Kolonu sam potom ispirala 6 puta sa po 5 mL pufera PBS nakon čega sam na kolonu dodala pročišćeni virus (ne više od 1 mL) i u mikroeprevetu skupila prvi eluat (frakcija 0). Nadalje sam u intervalima dodavala po 0,5 mL pufera PBS na kolonu uz istovremeno sakupljanje frakcija u mikroeprevete. Frakcije s virusom

sam zajedno skupila te im dodala glicerol tako da mu je konačan volumni udio 10 %. Suspenziju virusnih čestica HAdV26 sam potom razdijelila u alikvote i smrzнула pri -80 °C.

3.2.3. Inhibicija endocitoze posredovane klatrinom i infekcija virusom HAdV26

Stanice A549 i A549-E6 uzgajala sam i tretirala na isti način. Za inhibiciju endocitoze posredovane klatrinom stanice sam tretirala spojem *Pitstop 2*, a potom inficirala replikacijski defektnim virusom HAdV26. Eksperiment sam provela u četiri tipa uvjeta: (1) kontrolne netretirane i neinficirane stanice, (2) stanice tretirane samo *Pitstopom 2*, (3) stanice inficirane virusom HAdV26, i (4) stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

U pločice za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića nasadila sam 2×10^5 stanica po bunariću kako bi nakon 48 h konfluentnost stanica bila 80–90 %. Nasadila sam po jedan bunarić za svaki uvjet te dodatni, peti bunarić, za brojanje stanica kako bi količina dodanog virusa po stanici bila jednaka kod svih uvjeta. Stanice sam uzgajala u hranjivom mediju DMEM-FBS (10 %), a za daljnji tretman koristila sam medij DMEM-FBS (0.2 %). Nakon 48 h, stanicama sam maknula medij, napravila sam predtretman *Pitstopom 2* (30 min) radne koncentracije 20 μM , dok sam netretiranim uzrocima samo promijenila medij. Nakon inkubacije sa spojem, inficirala sam stanice virusom HAdV26 pri čemu je broj dodanih virusnih čestica po stanici (eng. *multiplicity of infection*, MOI) iznosio 10^4 , a suspenziju virusa pripremila sam u hranjivom mediju ili u 20 μM otopini *Pitstopa 2*, ovisno o uvjetu. Pločicu sa stanicama sam stavila 1 h u inkubator za uzgoj kulture stanica. Ovako tretirane stanice koristila sam za praćenje promjena u ekspresiji citokina, za detekciju količine izlučenih citokina i za analizu količine proteina kaskade MAPK.

3.2.4. Određivanje promjena u ekspresiji gena za citokine potaknutih infekcijom

3.2.4.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA

Nakon tretmana inhibitorom endocitoze posredovane klatrinom i infekcije stanica, uklonila sam medij, stanice sam isprala puferom DPBS (500 μL), potom odvojila od podloge korištenjem tripsina (500 μL), a zatim skupila u 1000 μL DPBS. Stanice sam potom centrifugirala (10 min; 1100 x g), a dobiveni talog stanica koristila sam za izolaciju ukupne RNA iz stanica i virusnih čestica. Za izdvajanje ukupne RNA koristila sam komplet *High Pure RNA Isolation Kit* prema uputama proizvođača. Koncentraciju RNA i provjeru kvalitete izolirane RNA odredila sam spektrofotometrijski mjerenjem asorbancije pri valnim duljinama

260 nm i 280 nm. Kao referentni uzorak pri mjerenju apsorbancije koristila sam pufer za eluciju iz navedenog kompleta. Kvalitetu RNA dodatno sam provjerila metodom elektroforezom na agaroznom gelu kako bi potvrdila cjelovitost molekula RNA. Agarozni gel (0.8 %) pripremila sam u 1 X TAE puferu. Detaljan sastav smjese jednog uzorka nalazi se u Tablici 7. Kao marker u jažicu gela stavila sam 2 μ l standarda za elektroforezu u gelu. RNA je razdvojena elektroforezom tijekom 15 min pri konstantnom naponu od 50 V, a nakon razdvajanja RNA sam vizualizirala pomoću uređaja *ChemiDoc Imaging System*.

Tablica 7. Sastav smjese jednog uzorka priređenog za analizu agaroznom gel elektroforezom

Komponenta	Količina
RNA	Nanijela sam 200 ng RNA; Potrebni volumen izračunala sam iz izmjerene koncentracije RNA (ng/ μ l)
Mili-QH ₂ O	12 μ l – volumen RNA
<i>Orange G</i>	3 μ l
Ukupno	15 μl

Ukupnu izoliranu RNA koristila sam za reakciju obrnutog prepisivanja (reverznu transkripciju, RT) pomoću komercijalno dostupnog kompleta *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* prema uputama proizvođača. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije koje sam koristila za sintezu jednolančane komplementarne DNA (cDNA) iz ukupne RNA navedeni su u Tablici 8. Dobivenu cDNA pohranila sam pri -80 °C te dalje koristila za kvantitativni qPCR.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za sintezu cDNA jednog uzorka i reakcijski uvjeti

Sastav reakcijske smjese				
Komponenta		Volumen (μl)		
10X RT pufer		2,0		
smjesa nukleotida 25X <i>dNTP Mix</i> (100 Mm)		0,8		
10X RT nasumične početnice		2,0		
reverzna transkriptaza <i>Multi Scribe</i>		1,0		
<i>Mili-Q H₂O</i>		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	∞

3.2.4.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

Za određivanje razine ekspresije citokina koristila sam lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu, tzv. kvantitativni PCR (qPCR, eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Metoda se sastoji od ponavljajućih ciklusa u kojima se DNA denaturira nakon čega dolazi do vezanja specifičnih početnica za pojedini gen te do produljivanja početnica i sinteze komplementarnog lanca pomoću DNA polimeraze. Za obilježavanje produkta reakcije koristila sam fluorescentnu boju *SYBR Green* koja se veže za novonastalu dvolančanu DNA pri čemu dolazi do emitiranja fluorescentnog signala. Mjerenjem fluorescencije nakon svakog ciklusa mjeri se količina nastale DNA jer je fluorescentni signal direktno proporcionalan broju kopija umnožene DNA. Kao finalni rezultat očitava se broj ciklusa (C_T , eng. *threshold cycle*) u kojem emisija fluorescencije prijeđe postavljeni prag iznad nespecifičnog signala. U ovom radu za qPCR koristila sam uređaj *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Thermo Fischer Scientific, SAD), a sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 9. Uzorcima sam odredila razinu ekspresije citokina IL-6, IL-8 i IFN- α , a za unutarnju kontrolu odredila sam ekspresiju jednoliko eksprimiranog (eng. *housekeeping*) gena GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, eng. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Predviđeno je da odredim i razinu ekspresije citokina TNF- α , no početnice za ovaj gen nisu davale zadovoljavajuće krivulje

taljenja (eng. *melting curve*). Za uspoređivanje razine ekspresije gena u kontrolnim stanicama i tretiranim stanicama rezultate sam analizirala pomoću komparativne CT metoda ($2^{-\Delta C_T}$, $\Delta\Delta C_T$) pri čemu sam napravila dvije normalizacije, jednu prema unutarnjoj kontroli (gen GAPDH), a drugu prema kontrolnom uzorku koji nije bio ni tretiran ni inficiran.

$$\Delta C_T(x) = C_T \text{ ispitivanog gena } (x) - C_T \text{ unutarnja kontrola } (x)$$

$$\Delta\Delta C_T = \frac{2^{-\Delta C_T(x)}}{2^{-\Delta C_T(ctrl)}}$$

x – uzorak

C_T – broj ciklusa (eng. *threshold cycle*) u kojem emisija fluorescencije prijeđe postavljeni prag iznad nespecifičnog signala

ctrl – kontrolni uzorak na kojem se radi normalizacija

Tablica 9. Sastav reakcijske smjese i uvjeti kvantitativne PCR reakcije

Sastav reakcijske smjese			
Komponenta		Volumen (μl)	
cDNA (1:500)		6	
reakcijska smjesa <i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i>		7,5	
početnica 1 (10 μM)		0,6	
početnica 2 (10 μM)		0,6	
<i>Mili-Q H₂O</i>		0,3	
Ukupno:		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

3.2.5. Određivanje količine izlučenih citokina

Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA, eng. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) je metoda pomoću koje sam odredila količine izlučenih citokina nakon prethodno opisanog tretmana stanica *Pitstopom 2* i infekcije virusom HAdV26. Postoje različite varijante ELISA metode koje se koriste za detekciju i kvantifikaciju specifičnih molekula u uzorku, no osnova svih je specifičnost interakcija između antigena i antitijela. Uzorke za metodu ELISA sakupila sam na način da sam stanicama nakon inkubacije s inhibitorom *Pitstopom 2* i infekcije maknula medij i dodala svježi (1,5 mL), a nakon 24 h sakupila sam supernatant te spremila ga pri -20 °C do same analize. U ovom radu za metodu ELISA koristila sam komercijalno dostupne ELISA testove *Human IL-6 Uncoated ELISA* i *Human IL-8 Uncoated ELISA* prema uputama proizvođača. Ovi testovi pripadaju tzv. *Sandwich ELISA* metodi te se sastoje od nekoliko koraka. Prvi korak je oblaganje bunarića mikrotitarskih ELISA pločica s antitijelom za hvatanje koje je specifično za traženi antigen, a u slučaju ovog rada to su bila antitijela za citokine IL-6 i IL-8. Bunariće sam potom isprala kako bi se uklonila nevezana antitijela te blokirala kako ne bi došlo do nespecifičnog vezanja za pločicu. Nakon oblaganja i blokiranja bunarića, dodala sam uzorak pri čemu se antigen, ukoliko je prisutan u uzorku, veže na antitijelo za hvatanje. Nakon potencijalnog vezanja slijedilo je ispiranje bunarića, a nakon toga sam dodala detekcijsko antitijelo koje je također specifično za isti antigen, ali za drugi epitop. Suvišak detekcijskog antitijela maknula sam ispiranjem bunarića. Detekcijsko antitijelo ima vezan biotin na koji se veže avidin dodatkom otopine avidin-HRP (eng. *horseradish peroxidase*). Nakon ispiranja, dodala sam supstrat koji enzim peroksidaza hrena prevodi u obojeni produkt koji sam kvantificirala spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 570 nm i 450 nm. Količinu izlučenih citokina odredila sam ekstrapolacijom iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o količini standarda. Kako bi usporedila dobivene vrijednosti između pojedinih uzoraka količinu izlučenih citokina normalizirala sam prema kontrolnom uzorku koji nije ni tretiran ni inficiran.

3.2.6. Analiza količine proteina kaskade MAPK

Za analizu količine aktivnih proteina kaskade MAPK (pNFkB, pERK i pp38) koristila sam metode SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza i westernsku analizu.

3.2.6.1. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza

SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE, eng. *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) je denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u

poliakrilamidnom gelu u kojoj se proteini razdvajaju na temelju molekulske mase. Anionski detergent natrij dodecil sulfata (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate*; SDS) denaturira proteine te se veže na njih u točno određenom omjeru čime svi postižu negativni naboj. Takva obrada proteina SDS-om omogućava njihovo razdvajanje u električnom polju na temelju razlike u njihovoj veličini.

Uzorke za SDS-PAGE sakupila sam metodom vrućeg pufera. Nakon tretmana i infekcije stanicama sam uklonila medij te dodala vrući 1 X SB pufer (150 μ L; zagrijan na 96 °C) za lizu stanica. Pomoću sterilne strugalice lizirane stanice sam odvojila od podloge i sakupila u mikroepruvete. Sakupljene stanične lizate sonificirala sam tri puta po 5 sekundi (30 % amplitude) te potom grijala na 96 °C tijekom 5 min. Tako pripremljeni uzorke nanijela sam u jažice gela.

Diskontinuirana elektroforeza koristi dva gela, gel za sabijanje koji omogućava koncentriranje uzoraka te gel za razdvajanje u kojem proteini putuju samo na temelju razlike u molekulskoj masi. Gelove sam pripremila u Falcon epruvetama prema sastavu navedenom u Tablici 10. U kalup za izlijevanje gela prvo sam stavila gel za razdvajanje, a nakon njegove polimerizacije na njega sam nadslojila gel za sabijanje. Završetkom polimerizacije, napravila sam 1 X SDS elektroforetski pufer te složila aparaturu za elektroforezu. U jažice gela Hamilton iglom nanijela sam uzorak proteina (25 μ L), a za određivanje molekulskih masa razdvojenih proteina u jednu sam jažicu nanijela proteinski marker za SDS-elektroforezu *PageRuler Prestained Protein Ladder* (1,5 μ L). Tijekom prolaska proteina kroz gel za sabijanje elektroforezu sam provodila pri konstantnom naponu od 80 V, a nakon ulaska proteina u gel za razdvajanje pri konstantnom naponu od 100 V. Nakon završene elektroforeze napravila sam transfer proteina s gela na membranu.

Tablica 10. Sastav gela za razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE

Komponente	Volumen (ml)	
	Gel za sabijanje 5 %	Gel za razdvajanje 10 %
reH ₂ O	2,1	4,0
akrilamid/bisakrilamid miks 30 %	0,5	3,3
pufer Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	0,38	-
pufer Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M)	-	2,5
10 % APS	0,03	0,1
10 % SDS	0,03	0,1
TEMED	0,003	0,004
Ukupni volumen:	3 mL	10 mL

3.2.6.2. Westernska analiza

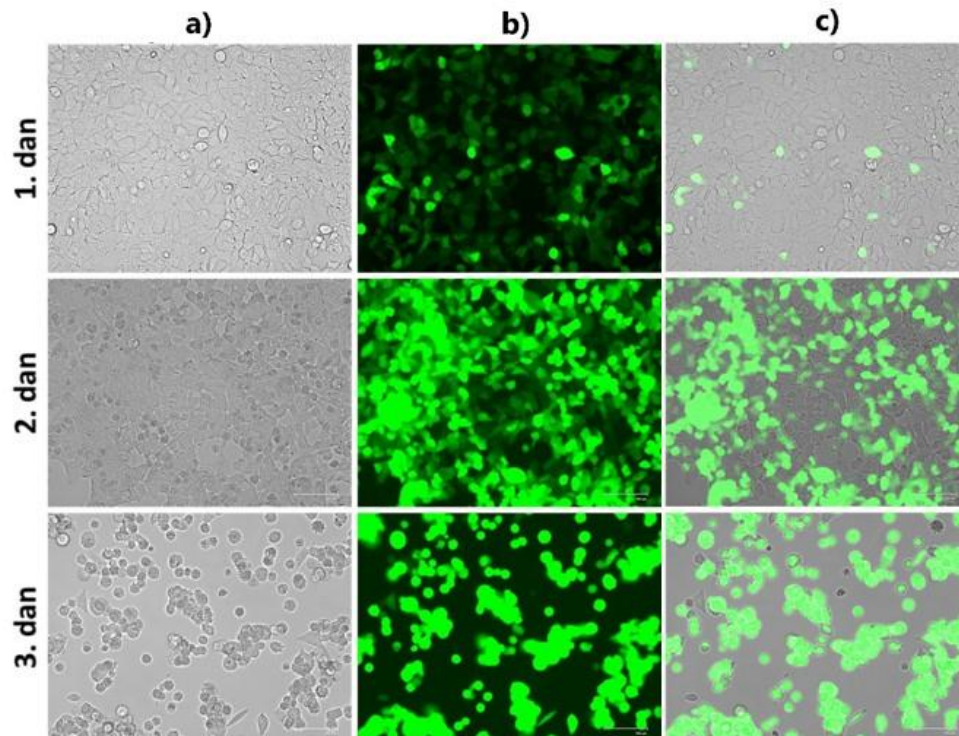
Westernska analiza temelji se na vezanju specifičnog antitijela na protein od interesa kako bi se odredila prisutnost tog proteina u kompleksnoj proteinskoj smjesi. Nakon završetka SDS-PAGE elektroforeze, proteine s gela prenijela sam na nitroceluloznu membranu mokrim prijenosom u polju struje jakosti 400 mA (90 min). Redoslijed slaganja sustava za prijenos od vrha do dna je: spužvica, filter papiri, membrana, gel, a zatim ponovno filter papiri pri čemu je membrana bliže pozitivno nabijenoj katodi, a gel bliže negativno nabijenoj anodi. Uspješnost prijenosa proteina provjerila sam bojanjem membrane otopinom Amidocrne boje na zibalici (2 min), nakon čega sam ju odbojavala uzastopnim izmjenama svježe otopine za odbojavanje do pojave jasnih vrpca. Membranu sam zatim isprala u puferu TBST, blokirala u 5 %-tnom mlijeku u puferu TBST pri sobnoj temperaturi (1 h), a zatim inkubirala preko noći primarnim protutijelima (4 °C) (Tablica 4). Blokiranjem membrane u 5 %-tnom mlijeku se sprječava nespecifično vezanje protutijela na membranu. Sljedeći dan membranu sam isprala jednom 15 min i tri puta po 5 min u puferu TBST nakon čega sam ju inkubirala s odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Nakon ponovnog ispiranja membrane vezanje sekundarnog protutijela vizualizirala sam uz pomoć kemiluminiscentnog reagensa *Pierce ECL Westernska analizating Substrate* prema uputama proizvođača na uređaju *ChemiDoc Imaging System*. Na istoj membrani napravila sam imunodetekciju više različitih proteina. Za uklanjanje vezanih

protutijela, membranu sam inkubirala u puferu za uklanjanje vezanih protutijela na zibalici (40 min; sobna temperatura) te potom blokirala u 10 %-tnom mlijeku u puferu TBST. Nakon provedenog postupka, membranu sam ponovno inkubirala primarnim, a zatim i sekundarnim protutijelom te vizualizirala po istom postupku. Za analizu kemiluminiscentnih signala specifičnih vrpca te signala za bojanje ukupnih proteina (Amidocrno bojanje) koristila sam program *ImageJ*. Kako bi dobila informaciju o količini fosforiliranog oblika ciljanih proteina za normalizaciju rezultata koristila sam količinu nefosforiliranog oblika proteina.

4. REZULTATI

4.1. Umnažanje virusa u stanicama HEK-293 i pročišćavanje na jastučiću i u gradijentu CsCl

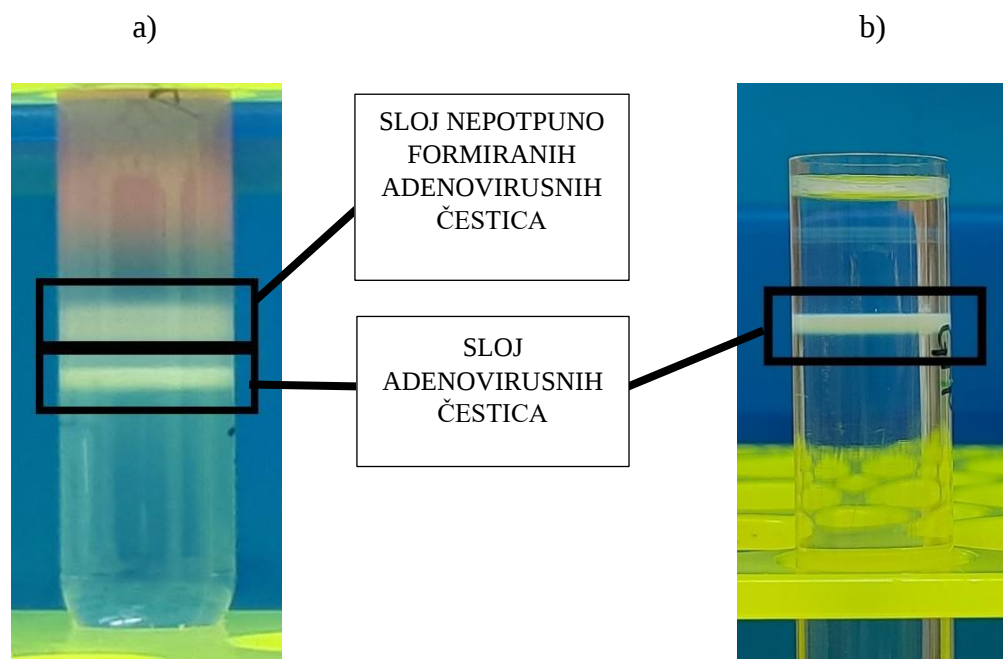
Zahvaljujući komplementaciji deletiranog dijela adenovirusnog genoma stanica HEK-293, virusne su čestice uspješno inficirale staničnu kulturu i replicirale se. Uspješna infekcija stanica rezultirala je citopatogenim efektom koji se očitovao u zaokruživanju stanica i odvajanju od podloge. Potpun citopatogeni efekt postignut je 3. dan nakon infekcije što je bilo vidljivo iz rezultata analize na sustavu *EVOS Cell Imaging* na kojem sam tijekom tri dana pratila tijek infekcije (Slika 4). Fluorescencija potječe od zelenog fluorescentnog proteina (eGFP) kojeg eksprimira virus. Intenzitet fluorescencije rastao je s vremenom, odnosno, s danima trajanja infekcije, i poklapa se s pojavom citopatogenog efekta što ukazuje na uspješnu replikaciju HAdV26 i širenje infekcije u okolne stanice. Kod drugog dana infekcije bilo je još dosta stanica pričvršćenih za podlogu pa se čini da je fluorescencija tada bila jača nego trećeg dana kada su se zbog citopatogenog efekta stanice zaokružile i određen broj odvojio od podloge.



Slika 4. Praćenje infekcije stanica HEK-293 adenovirusom tipa 26 pomoću sustava *EVOS Cell Imaging* kroz tri dana na svijetlom polju (a), pod zelenom svjetlosti (b) te preklopnim prikazom (c). Infekcija je

praćena do pojave potpunog citopatogenog efekta koji je vidljiv 3. dan infekcije. Fluorescencija potječe od zelenog fluorescentnog proteina (eGFP) kojeg eksprimira virus.

Na Slici 5.a) prikazana je epruveta nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl, a na slici 5.b) nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl u kojima sam pročišćavala uspješno umnožene adenovirusne čestice. Uspješno centrifugiranje na jastučiću CsCl rezultiralo je pojavom dva bijela sloja virusnih čestica. U donjem, oštrijem sloju bile su vidljive potpune adenovirusne čestice, dok se iznad njega nalazio deblji sloj kojeg su činile adenovirusne čestice bez DNA ili neugrađeni proteini kapside. Daljnjim centrifugiranjem u gradijentu CsCl adenovirusne čestice zaustavile su se u području koje odgovara njihovoj gustoći te formirale oštar i jasan bijeli sloj. Nakon centrifugiranja, iz pročišćenog virusa HAdV26 uklonila sam CsCl tehnikom gel-filtracije te skupila eluate pročišćenog virusa.



Slika 5. Pročišćavanje adenovirusa tipa 26 (HAdV26). a) Slojevi dobiveni nakon centrifugiranja na jastučiću CsCl. Sloj ukoncentriranih adenovirusnih čestica vidljiv je kao oštra, bijela crta na granici CsCl različitih gustoća. Iznad sloja adenovirusnih čestica vidljiv je sloj nepotpuno formiranih virusnih čestica. b) Sloj HAdV26 nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl. Adenovirusne čestice se nalaze u području koje odgovara njihovoj gustoći, 1,34 g/mL.

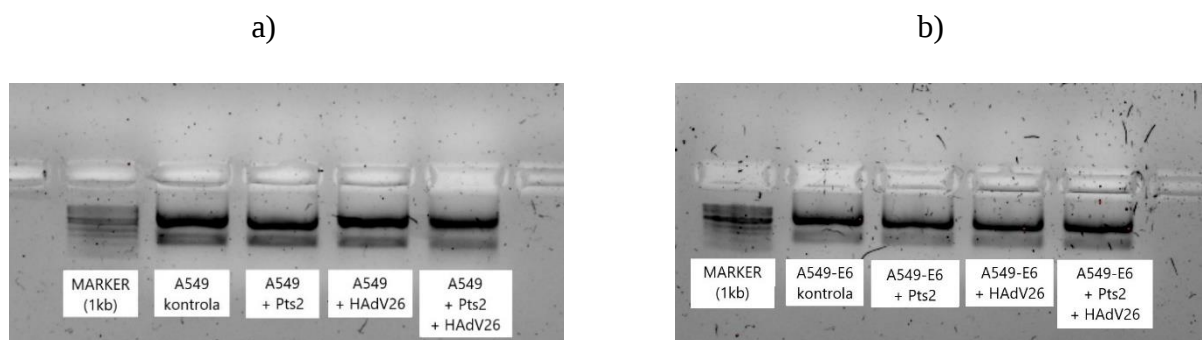
4.2. Utjecaj inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na ekspresiju gena za citokine IL-6, IL-8 i IFN- α potaknutu infekcijom

Prethodno je u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala pokazano da *Pitstop 2* zaustavlja unutarstanično putovanje adenovirusnih čestica zadržavajući ih u vezikulama ispod stanične membrane. Također, pokazano je da tretiranje stanica *Pitstopom 2* povećava vezanje i ulazak HAdV26, pri čemu se na površini stanica ne mijenja ekspresija integrina $\alpha\beta 3$, ključnog receptora za ulazak HAdV26. Učinak inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na ekspresiju citokina potaknutu infekcijom virusom HAdV26 paralelno sam promatrala u staničnoj liniji A549 i njenom klonu A549-E6 koji ima povećanu ekspresiju integrina $\alpha\beta 3$.

U Tablici 11. prikazane su spektrofotometrijski određene vrijednosti koncentracija izolirane ukupne RNA (stanične i virusne) te omjer izmjerenih apsorbancija RNA pri 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) za uzorke stanica A549 i A549-E6. Omjer izmjerenih apsorbancija iznosio je između 1,8 i 2,1 za sve uzroke što pokazuje da RNA nije onečišćena proteinima te da je izolacija bila uspješna. Uspješnost izolacije RNA dodatno je potvrđena razdvajanjem izolirane RNA elektroforezom na agaroznom gelu čiji su rezultati za uzroke stanica A549 (a) i A549-E6 (b) prikazani na Slici 6. U svakom uzorku bile su vidljive dvije uobičajene vrpce RNA molekule, gornja koja je predstavljala 28S ribosomsku RNA i donja, 18S ribosomska RNA, čime je utvrđena cjelovitost i čistoća izolirane RNA. Vrpce RNA između uzoraka pojedinih staničnih linija bile su usporedive debljine što je potvrdilo izmjerenu koncentraciju RNA s obzirom na to da sam na gel nanijela jednaku količinu uzorka. Uspješno izoliranu RNA sam dalje koristila za određivanje razine ekspresije citokina IL-6, IL-8 i IFN- α koje sam odabrala s obzirom na preliminarne rezultate dobivene u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala koji su pokazali da je njihova ekspresija povećana uslijed infekcije virusom HAdV26.

Tablica 11. Prikaz vrijednosti omjera izmjerenih apsorbancija RNA molekula pri 260 i 280 nm te koncentracije RNA za uzroke stanice A549 i A549-E6. Uzorci: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane Pitstopom 2 (Pts2), 3. stanice inficirane adenovirusom tipa 26 (HAdV26), 4. stanice tretirane Pitstopom 2 i inficirane virusom HAdV26.

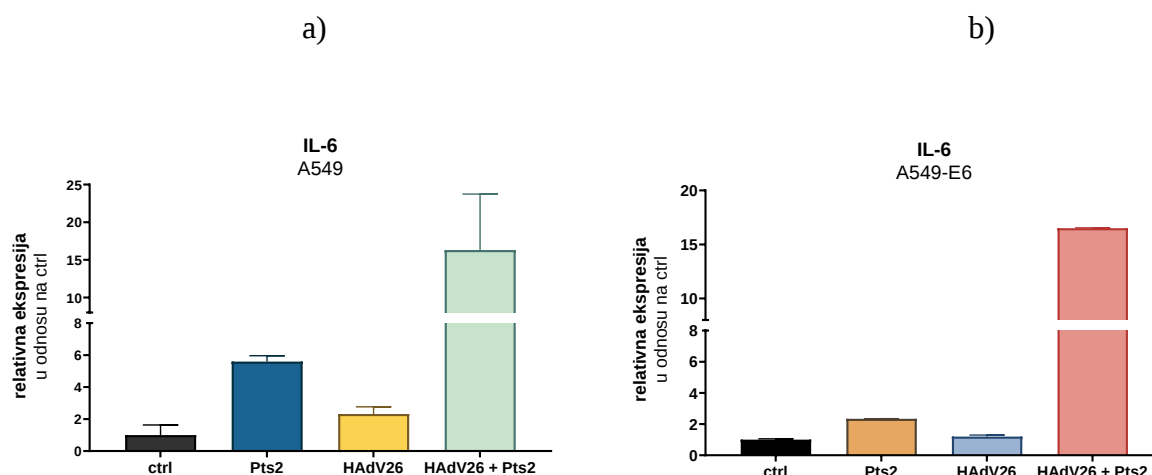
	Uzorak	A_{260}/A_{280}	Koncentracija RNA (ng/ μ l)
A549	1. A549 ctrl	2,08	263
	2. A549 + Pts2	2,11	202,4
	3. A549 + HAdV26	2,07	246
	4. A549 + Pts2 + HAdV26	1,76	33,5
A549-E6	1. A549-E6 ctrl	2,06	49,2
	2. A549-E6 + Pts2	2,12	175,6
	3. A549-E6 + HAdV26	2,11	131,1
	4. A549-E6 + Pts2 + HAdV26	2,12	129,9



Slika 6. RNA izolirana iz uzoraka stanica A549 (a) i A549-E6 (b) i razdvojena elektroforezom na agaroznom gelu. Dvije linije razdvojene RNA u uzorcima predstavljaju 28S (gornja) i 18S (donja) ribosomsku RNA. Uzorci s lijeva na desno: 1. marker - standard za elektroforezu u gelu 1 kb, 2. ctrl - kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 3. stanice tretirane *Pistopom* 2 (Pts2), 4. stanice inficirane adenovirusom tipa 26 (HAdV26), 5. stanice tretirane *Pistopom* 2 i inficirane virusom.

Metodom qPCR pokazano je da je IL-6 povećano eksprimiran (2,3 puta) u stanicama A549 nakon infekcije virusom HAdV26. Infekcija stanica A549-E6 nije uzrokovala povećanje

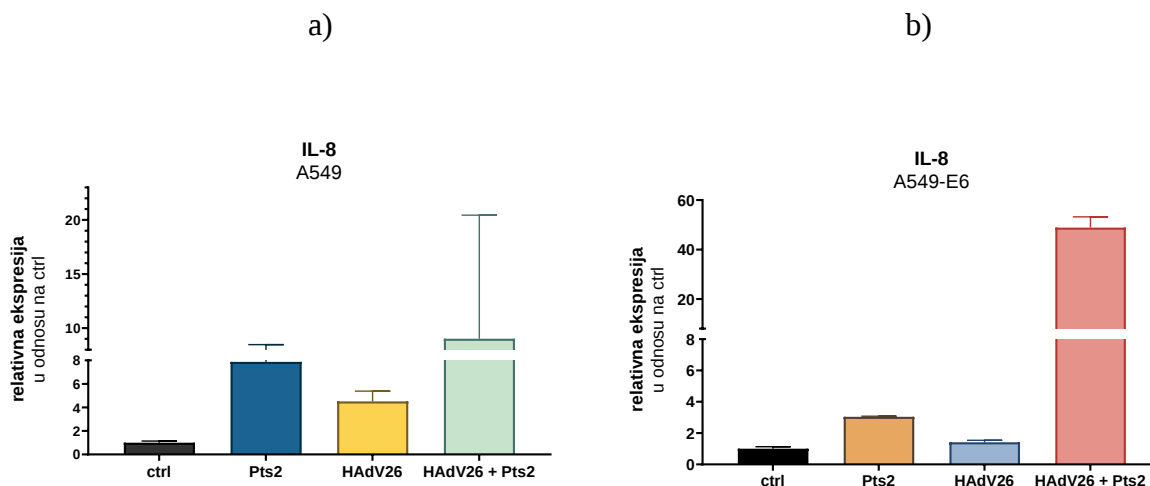
ekspresije ovog citokina. U obje stanične linije tretman inhibitorom *Pitstopom 2* povećao je ekspresiju citokina IL-6 (5,6 puta kod A549 te 2,3 puta kod A549-E6), dok je najveće povećanje ekspresije citokina IL-6 (16,3 puta kod A549 i 16,5 puta kod A549-E6) primijećeno kod stanica koje su bile i tretirane inhibitorom i inficirane virusom HAdV26 (Slika 7).



Slika 7. Ekspresija citokina IL-6 u staničnim linijama A549 (a) i A549-E6 (b) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* te infekcije adenovirusom tipa 26. Stanice su tretirane *Pitstopom 2* (30 min) i inkubirane virusom (1h, 37 °C; MOI 10⁴). Ekspresija citokina IL-6 određena je metodom qPCR korištenjem specifičnih početnica. Rezultati su analizirani pomoću komparativne C_T metode (2^{-ΔCT}, ΔΔCT) koja se temelji na dvije normalizacije, jedna prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen GAPDH), a druga prema kontrolnom uzorku (netretirane i neinficirane stanice). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom 2* (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

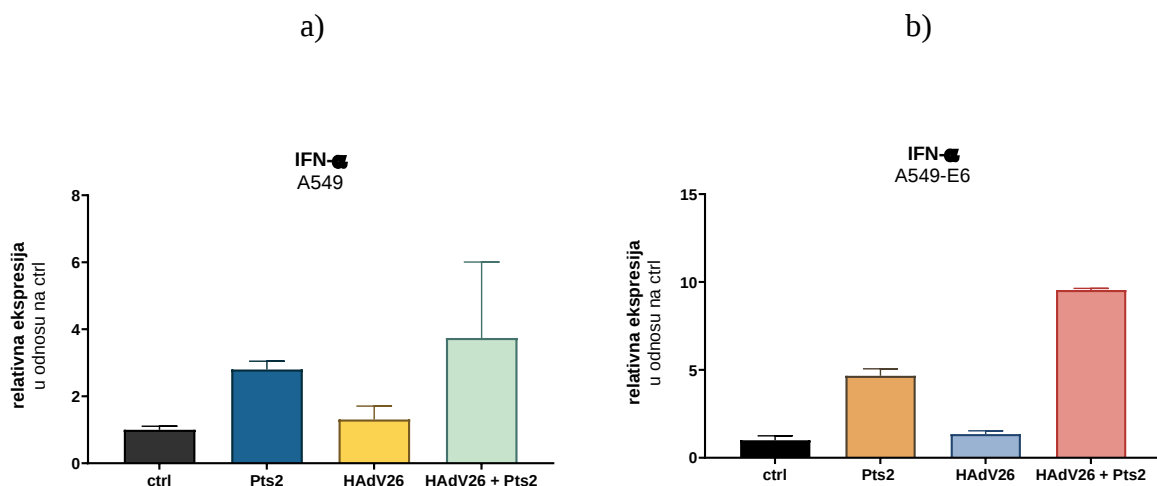
Ekspresija kemokina IL-8 povećana je nakon infekcije stanica A549 virusom HAdV26 (4,5 puta), a u stanicama A549-E6 ostaje gotovo nepromijenjena u odnosu na kontrolne stanice (1,4 puta). Inhibicija endocitoze posredovane klatrinom povećala je ekspresiju kemokina IL-8 u obje stanične linije te je, kao i ekspresija citokina IL-6, više povećana u stanicama A549 (7,9 puta) u usporedbi sa staničnom linijom A549-E6 (3 puta veća). Tretman *Pitstopom 2* i infekcija virusom HAdV26 najviše su povećali ekspresiju ovog kemokina u obje stanične linije (9 puta kod A549 i 8,9 puta kod A549-E6). Istovremeni tretman stanica s *Pitstopom 2* i infekcija

značajnije su povećali ekspresiju kemokina IL-8 nego sam tretman stanica *Pitstopom 2* (Slika 8.).



Slika 8. Ekspresija kemokina IL-8 u staničnim linijama A549 (a) i A549-E6 (b) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* te infekcije adenovirusom tipa 26. Stanice su tretirane *Pitstopom 2* (30 min) i inkubirane virusom (1 h, 37 °C; MOI 10⁴). Ekspresija kemokina IL-8 određena je metodom qPCR korištenjem specifičnih početnica. Rezultati su analizirani pomoću komparativne C_T metode ($2^{-\Delta CT}$, $\Delta\Delta CT$) koja se temelji na dvije normalizacije, jedna prema endogenoj kontroli (konstitutivno ekspimiran gen, GAPDH), a druga prema kontrolnom uzorku (netretirane i neinficirane stanice). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom 2* (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

Infekcija stanica A549 i A549-E6 virusom HAdV26 nije značajno povećala ekspresiju citokina IFN- α u obje stanične linije (1,3 puta kod A549 i A549-E6). Suprotno, nakon tretmana *Pitstopom 2* ekspresija ovog citokina povećana je 2,8 puta kod stanica A549 i 4,7 puta kod stanica A549-E6. Kao i za IL-6 i IL-8, najveća ekspresija citokina IFN- α uočena je kod stanica kojima je inhibirana endocitoza posredovana klatrinom i koje su inficirane virusom HAdV26 (3,7 puta kod A549 i 9,5 puta kod A549-E6). Kod obje stanične linije tretman *Pitstopom2* i infekcija virusom značajnije su povećali ekspresiju citokina IFN- α u odnosu na sam tretman *Pitstopom2* (Slika 9).

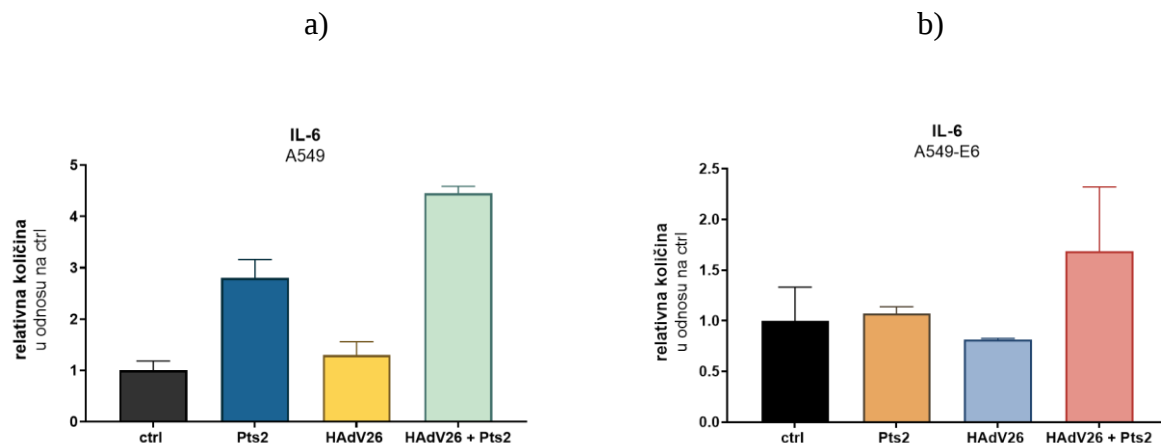


Slika 9. Ekspresija citokina IFN- α u staničnim linijama A549 (a) i A549-E6 (b) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* te infekcije adenovirusom tipa 26. Stanice su tretirane *Pitstopom 2* (30 min) i inkubirane virusom (1 h, 37 °C; MOI 10^4). Ekspresija citokina IFN- α određena je metodom qPCR korištenjem specifičnih početnica. Rezultati su analizirani pomoću komparativne C_T metode ($2^{-\Delta CT}$, $\Delta\Delta CT$) koja se temelji na dvije normalizacije, jedna prema endogenoj kontroli (konstitutivno eksprimiran gen, GAPDH), a druga prema kontrolnom uzorku (netretirane i neinficirane stanice). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom 2* (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

4.3. Utjecaj inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na količinu izlučenih citokina IL-6 i IL-8 uslijed infekcije

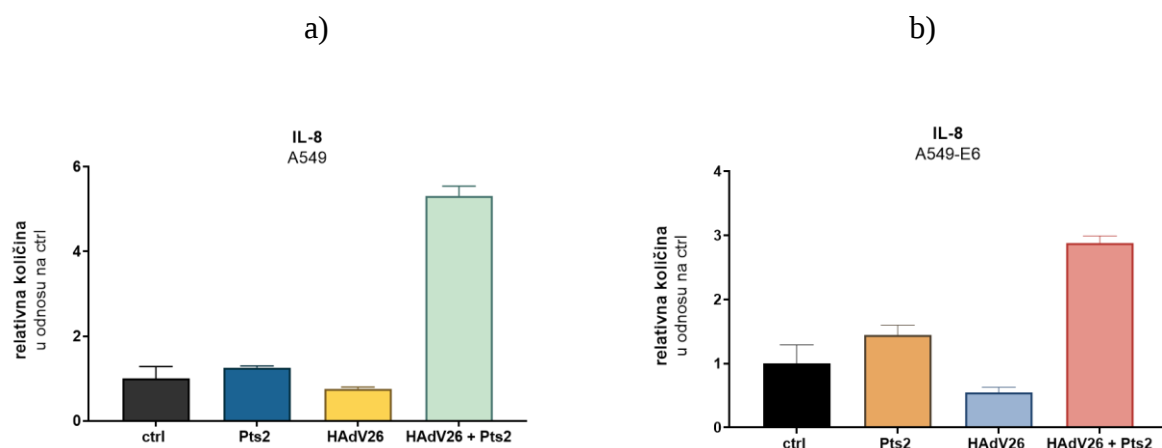
U ovom diplomskom radu, osim promjena na razini ekspresije gena za citokine, istražila sam i utjecaj inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na količinu izlučenih citokina uslijed infekcije stanica A549 i A549-E6 virusom HAdV26. Analizom sakupljenog supernatanta metodom ELISA pokazano je da infekcija stanica A549 virusom HAdV26 nije imala utjecaj na izlučivanje citokina IL-6, međutim, povećana količina izlučenog citokina IL-6 (2,8 puta) uočena je nakon tretmana stanica *Pitstopom 2*. Kod stanica A549-E6 niti infekcija virusom HAdV26 niti tretman *Pitstopom 2* nisu imale utjecaj na izlučivanje citokina IL-6. Inhibicija endocitoze *Pitstopom 2* i infekcija virusom dovele su do povećanog izlučivanja citokina IL-6 u medij kod obje stanične linije. Veća količina izlučenog citokina IL-6 zabilježena je kod stanica A549 (4,4 puta) u usporedbi sa stanicama A549-E6 (1,69 puta), no u obje stanične linije

istodobna inhibicija endocitoze i infekcija virusom uzorkovala je najveće izlučivanje citokina IL-6 u usporedbi s preostala tri uvjeta (Slika 10).



Slika 10. Izlučivanje citokina IL-6 u staničnim linijama A549 (a) i A549-E6 (b) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* te infekcije adenovirusom tipa 26. Stanice su tretirane *Pitstopom 2* (30 min) i virusom (1 h, 37 °C; MOI 10⁴) nakon čega je hranjivi medij zamijenjen medijem bez inhibitora i virusa. Supernatant iznad stanica sakupljen je nakon infekcije (24 h) te korišten za analizu količine citokina metodom ELISA. Količina izlučenih citokina određena je ekstrapolacijom iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o količini standarda te normalizirana prema kontrolnom uzorku (netretirane i neinficirane stanice). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom 2* (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

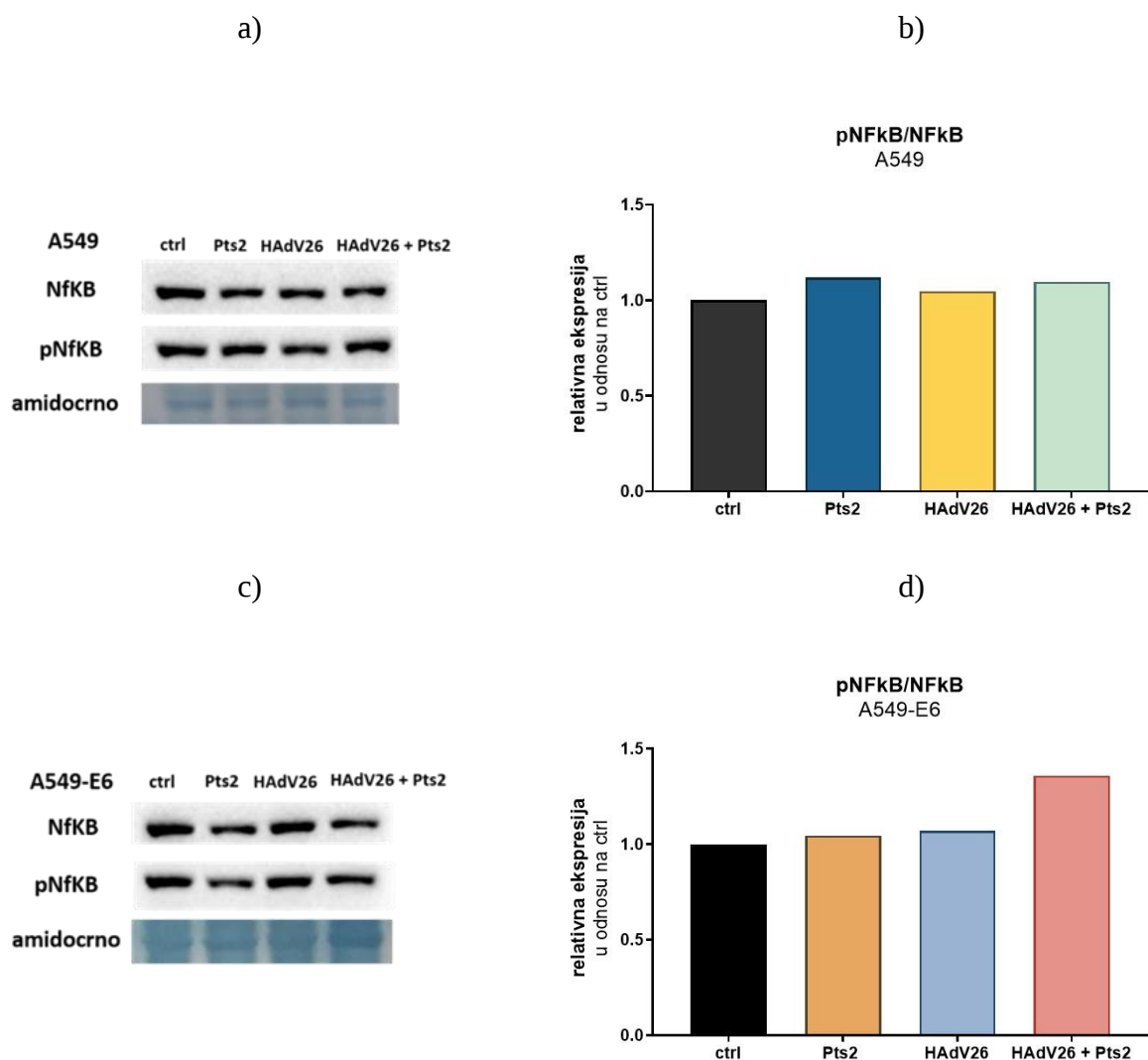
Kao i kod lučenja citokina IL-6, infekcija obje stanične linije virusom HAdV26 nije utjecala na izlučivanje kemokina IL-8. Tretman stanica *Pitstopom 2* također nije utjecao na lučenje kemokina IL-8 kod obje stanične linije. Međutim, tretman *Pitstopom 2* i infekcija virusom HAdV26 doveli su do povećanog lučenja kemokina IL-8 u medij (5,3 puta kod A549 te 2,89 puta kod A549-E6), u odnosu na preostala tri uvjeta (Slika 11).



Slika 11. Izlučivanje kemokina IL-8 iz staničnih linija A549 (a) i A549-E6 (b) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* te infekcije adenovirusom tipa 26. Stanice su tretirane *Pitstopom 2* (30 min) i inkubirane virusom (1 h, 37 °C; MOI 10⁴) nakon čega je hranjivi medij zamijenjen medijem bez inhibitora i virusa. Supernatant iznad stanica sakupljen je nakon infekcije (24 h) te je korišten za analizu količine citokina metodom ELISA. Količina izlučenih citokina određena je ekstrapolacijom iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o količini standarda te normalizirana prema kontrolnom uzorku (netretirane i neinficirane stanice). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom 2* (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

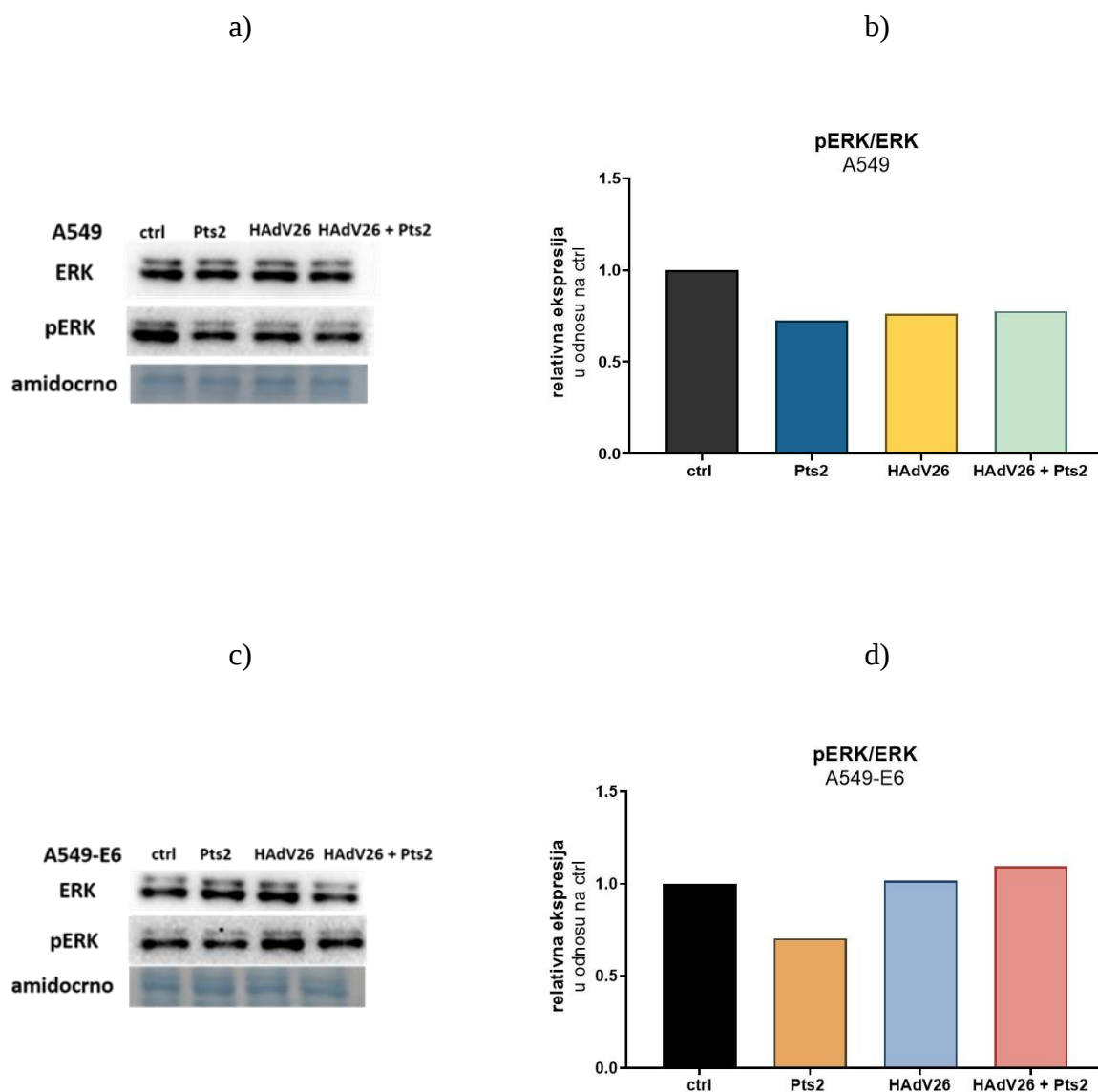
4.4. Utjecaj inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na aktivaciju proteina signalne kaskade MAPK nakon infekcije

Kako bih istražila ulogu inhibicije endocitoze posredovane klatrinom na aktivaciju signalne kaskade MAPK uslijed infekcije stanica A549 i A549-E6 virusom HAdV26, proučavala sam aktivaciju MAP kinaza ERK i p38 te transkripcijskog faktora NFkB. S obzirom da je aktivnost navedenih proteina posljedica fosforilacije, količinu fosforiliranog oblika proteina normalizirala sam prema nefosforiliranom obliku te je kod obje stanične linije utvrđeno da niti infekcija virusom HAdV26 niti inhibicija endocitoze *Pitstopom 2* nisu utjecale na aktivaciju proteina NFkB. Također, istodobni tretman s *Pitstopom2* i infekcija virusom nisu imali utjecaj na aktivaciju proteina NFkB u obje stanične linije, A549 i A549-E6 (Slika 12).



Slika 12. Relativna ekspresija fosforiliranog oblika proteina NFkB (pNFkB) u odnosu na nefosforilirani oblik NFkB u stanicama A549 (a, b) i A549-E6 (c, d) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* i infekcije adenovirusom tipa 26 (HAdV26). Stanice su tretirane *Pitstopom 2* (30 min) i inkubirane virusom (1 h, 37 °C; MOI 10⁴) nakon čega su stanice sakupljene metodom vrućeg pufera. Proteini su razdvojeni metodom SDS-PAGE i analizirani westernskom analizom korištenjem specifičnih protutijela. Količina aktivnog, fosforiliranog oblika NFkB normalizirana je prema količini nefosforiliranog oblika proteina. Kemiluminiscentni signal specifičnih vrpca za NFkB i pNFkB te signal za bojanje ukupnih proteina (amidocrno) za stanice A549 (a) i A549-E6 (c). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom 2* (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

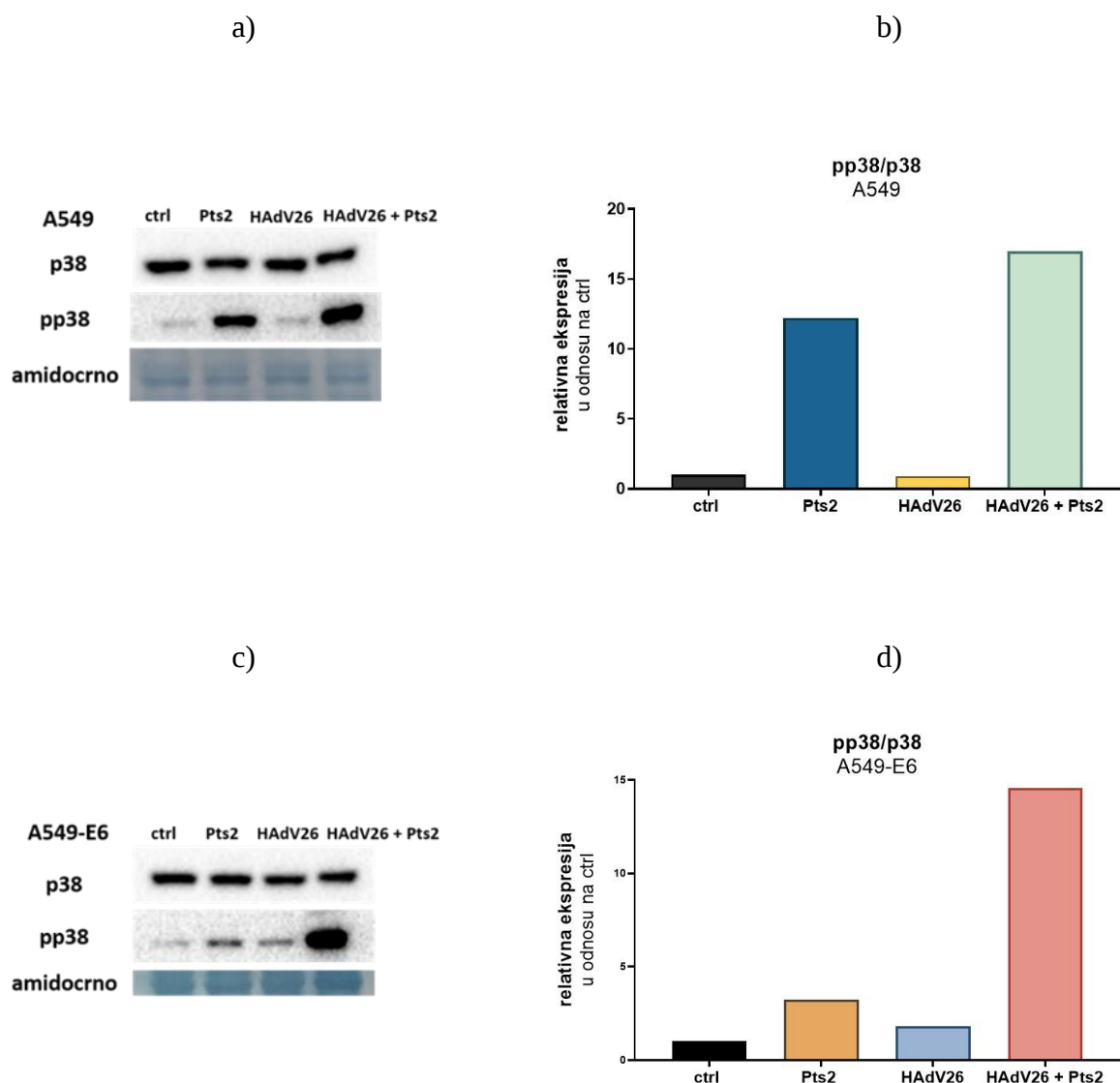
Proučavanjem proteina ERK u obje stanične linije primijećeno je da niti infekcija virusom HAdV26 niti inhibicija endocitoze nisu imale značajan utjecaj na aktivaciju kinaze. Također, kod obje stanične linije, A549 i A549-E6, nije uočena razlika u aktivaciji kinaze ERK kod stanica koje su tretirane *Pitstopom2* i inficirane virusom (Slika 13).



Slika 13. Relativna ekspresija fosforiliranog oblika proteina ERK (pERK) u odnosu na nefosforilirani oblik ERK u stanicama A549 (a, b) i A549-E6 (c, d) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* i infekcije adenovirusom tipa 26. Stanice su tretirane *Pitstopom 2* (30 min) i inkubirane virusom (1 h, 37 °C; MOI 10⁴) nakon čega su stanice skupljene metodom vrućeg pufera. Proteini su razdvojeni metodom SDS-PAGE i analizirani westernskom analizom korištenjem specifičnih protutijela. Količina aktivnog, fosforiliranog oblika ERK normalizirana je prema količini

nefosforiliranog oblika proteina. Kemiluminiscentni signal specifičnih vrpce za ERK i pERK te signal za bojanje ukupnih proteina (amidocrno) za stanice A549 (a) i A549-E6 (c). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom 2* (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom 2* i inficirane virusom HAdV26.

Količina pp38, aktivnog fosforiliranog oblika kinaze p38, povećana je u obje stanične linije nakon tretmana *Pitstopom 2* i infekcije virusom HAdV26 (16,9 puta kod A549 i 14,5 puta kod A549-E6). Infekcija virusom nije utjecala na aktivaciju kinaze p38, dok je inhibicija endocitoze *Pitstopom 2* u obje stanične linije povećala aktivaciju p38 (12,1 puta kod A549 i 3,2 puta kod A549-E6), no u manjoj mjeri nego istovremeni tretman *Pitstopom 2* u kombinaciji s infekcijom (Slika 14).



Slika 14. Relativna ekspresija fosforiliranog oblika proteina p38 (pp38) u odnosu na nefosforilirani oblik p38 u stanicama A549 (a, b) i A549-E6 (c, d) nakon inhibicije endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom* 2 i infekcije adenovirusom tipa 26. Stanice su tretirane *Pitstopom* 2 (30 min) i inkubirane virusom (1h, 37 °C; MOI 10⁴), nakon čega su stanice sakupljene metodom vrućeg pufera. Proteini su razdvojeni metodom SDS-PAGE i analizirani westernskom analizom korištenjem specifičnih protutijela. Količina aktivnog, fosforiliranog oblika p38 normalizirana je prema količini nefosforiliranog oblika proteina. Kemiluminiscentni signal specifičnih vrpca za p38 i pp38 te signal za bojanje ukupnih proteina (amidocrno) za stanice A549 (a) i A549-E6 (c). Uzorci s lijeva na desno: 1. ctrl – kontrolne netretirane i neinficirane stanice, 2. stanice tretirane *Pitstopom* 2 (Pts2), 3. stanice inficirane virusom HAdV26, 4. stanice tretirane *Pitstopom* 2 i inficirane virusom HAdV26.

5. RASPRAVA

Adenovirusi su najčešće korišteni virusni vektori u genskoj terapiji, liječenju tumora te cijepljenju protiv zaraznih bolesti. Unatoč mnogim prednostima, poput visoke efikasnosti dostave transgena u stanice, jednostavnosti proizvodnje te poticanja snažnog imunskog odgovora domaćina na cjepivo, postoje i određene prepreke koje ograničavaju njihovo korištenje (Gonçalves i de Vries 2006, Majhen i sur. 2014). Jedno od ključnih ograničenja prilikom primjene adenovirusnih vektora kod liječenja ljudi je visoka seroprevalencija određenih serotipova, poglavito virusa HAdV5, što smanjuje sposobnost vektora u dostavi željenog gena u stanice i/ili poticanje specifičnog imunskog odgovora domaćina prilikom cijepljenja. Kako bi se prevladala ta prepreka, znanstvena istraživanja idu u smjeru konstrukcije vektora temeljenih na niskoseroprevalentnim tipovima adenovirusa, poput virusa HAdV26 (Abbink i sur. 2007, Barouch i sur. 2011). Trenutno su na tržištu Europe tri odobrena cjepiva koja se temelje na rekombinantnom vektoru HAdV26, protiv Ebole (*Zabdeno*) i protiv Covid-19 (*Janssen* i *Sputnik V*), a u kliničkim ispitivanjima su cjepiva protiv HIV-a, Zika virusa, malarije te HPV-a. Unatoč brojnim kliničkim istraživanjima virusa HAdV26 koja opisuju dobar *in vivo* imunski odgovor domaćina na infekciju, osnovna biologija ovog virusa, kao što je korištenje receptora, način ulaska i putovanje unutar stanice još uvijek nije dovoljno istraženo. Istraživanja ove problematike i nova saznanja o adenovirusima pridonijet će lakšoj manipulaciji virusom HAdV26 i konstrukciji boljih vektora.

Imunosni sustav domaćina može detektirati adenovirus gotovo tijekom svih koraka infekcije, od vezanja na receptore i endocitoze do unutarstaničnog putovanja. Početna faza infekcije koja uključuje vezanje adenovirusa na receptore, okidanje signalnih puteva i ulazak u stanicu, može potaknuti ekspresiju pro-upalnih citokina koji zatim utječu na stanice u okolini, upozoravajući ih na prisustvo patogena i potiču upalu. Epitelne stanice posjeduju receptore za prepoznavanje specifičnih dijelova i/ili uzoraka na patogenima koji im omogućuju da brzo reagiraju na infekciju. Prepoznavanjem putem receptora, u epitelnim se stanicama aktiviraju pro-upalni signali ubrzo nakon interakcije s virusom. Prema tome, istraživanje imunskog odgovora epitelnih stanica, kao što je identifikacija citokina i molekula uključenih u ekspresiju istih, važno je u kontekstu upotrebe adenovirusnih vektora, posebice vektora HAdV26 kod kojeg nije dovoljno istražen urođeni imunski odgovor stanice koji se aktivira tijekom ulaska virusa.

U ovom sam radu istraživala utječe li, i na koji način, endocitoza posredovana klatrinom na ekspresiju citokina u epitelnim stanicama uslijed infekcije virusom HAdV26. U stanicama je endocitoza posredovana klatrinom inhibirana korištenjem kemijskog spoja *Pistop 2* za kojeg je u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković, gdje je rađen ovaj diplomski rad, pokazano da zaustavlja adenovirusne čestice HAdV26 ispod stanične membrane onemogućujući im unutarstanično putovanje. Rezultati dobiveni istraživanjem u okviru ovog diplomskog rada pokazuju da inhibicija endocitoze posredovane klatrinom *Pitstopom 2* povećava ekspresiju gena za citokine IL-6, IL-8 i IFN- α uslijed infekcije epitelne stanice virusom HAdV26. Također, tretman stanica *Pistopom 2* povećava izlučivanje citokina IL-6 i IL-8 24 sata nakon infekcije virusom HAdV26 što se slaže s rezultatima o povećanoj ekspresiji gena za citokine IL-6 i IL-8 nakon tretmana stanica *Pitstopom 2* i infekcije. Pokazano je da inhibicija *Pitstopom 2* u kombinaciji s infekcijom aktiviraju MAP kinazu p38, no ne utječu na aktivaciju MAP kinaze ERK niti transkripcijskog faktora NFkB. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je MAP kinaza p38 uključena u prijenos signala odnosno signalni put koji dovodi do ekspresije upalnih citokina u epitelnim stanicama A549 i A549-E6 uslijed inhibicije endocitoze posredovane klatrinom i infekcije, dok kinaza ERK i transkripcijski faktor NFkB nisu uključeni.

Istraživanja su pokazala da infekcija adenovirusima potiče snažan i raznolik urođeni imunosni odgovor koji uključuje ekspresiju gena za brojne pro-upalne citokine, kao što su IL-6 i kemokin IL-8, te stvaranje IFN tipa I koji stanici služe kao obrana od virusa (Hendrix i sur. 2014., Fejer i sur. 2011, Chen i Lee 2013). Wu i sur. (2010) su pokazali da HAdV7 iz grupe B potiče ekspresiju i izlučivanje citokina IL-6 i IL-8, u razdoblju do 8h nakon infekcije, u modelu tkiva ljudskih pluća, a imunohistokemijskim bojanjem utvrđeno je da su epitelne stanice pluća, a ne makrofagi izvor kemokina IL-8. Huarte i sur. (2006) su pokazali da adenovirusni vektori potiču ekspresiju gena za citokine IFN- α i IFN- β te izlučivanje ovih proteina u supernatant, 6 i 24h nakon infekcije u plazmocitoidnim i mijeloidnim dendritičkim stanicama miša. Adenovirusom potaknuta ekspresija IFN- α i IFN- β u dendritičkim stanicama miša dokazana je i u *in vivo* sustavu nakon intravenske injekcije s adenovirusnim vektorom. U istom je istraživanju utvrđeno da infekcija virusom HAdV dovodi do povećane ekspresije gena za citokine IFN- α i IFN- β i u ljudskim mononuklearnim stanicama periferne krvi, 6 i 24h nakon infekcije. Adenovirusom potaknuto lučenje citokina IFN tipa I u ljudi pokazano je u *in vivo*, detekcijom proteina IFN- α i IFN- β u serumima onkololoških pacijenata kojima je, u svrhu kliničkog istraživanja učinkovitosti genske terapije tumora s rekombinantnim adenovirusnim

vektorima, intratumorski administriran rekombinantni adenovirusni vektor. Poticanje ekspresije citokina IFN tipa I u dendritičkim stanicama, uslijed infekcije adenovirusom, pokazali su i Basner-Tschakarjan i sur. (2006). Infekcijom konvencionalnih i plazmocitoidnih dendritičkih stanica miša s rekombinantnim replikativno nesposobnim virusom HAdV pokazali su promjenu u ekspresiji gena za citokine IL-6 i IFN- α što je uzrokovalo značajno izlučivanje ovih proteina u supernatant, 18 - 24h nakon infekcije. Dendritičke stanice glavni su proizvođači interferona te je njihova aktivacija uslijed infekcije s virusom ključna poveznica urođenog i adaptivnog imunosnog odgovora. Za HAdV26 ne postoji puno istraživanja koja opisuju urođeni imunosni odgovor stanice na infekciju. Teigler i sur. (2012) su pokazali da HAdV26 potiče značajan *in vivo* urođeni imunosni odgovor u majmunima karakteriziran upalnim i antivirusnim citokinima i kemokinima. Analizom seruma majmuna cijepljenih s različitim vektorima HAdV pokazali su da cijepljenje virusom HAdV26 potiče povećano lučenje antivirusnih citokina IFN- γ i IP-10 (eng. *interferon-inducible protein 10*) te pro-upalnih citokina IL-6 i IL-1RA (eng. *interleukin receptor antagonist*) 24h nakon vakcinacije te da su razine izlučenih citokina značajno veće od razina potaknutih vakcinacijom visokoseroprevalentnim virusom HAdV5. U istom radu prikazani su rezultati *in vitro* studija na ljudskim perifernim stanicama krvi koji pokazuju da infekcija virusom HAdV26 potiče lučenje citokina IFN- α i IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , MIP-1 α i β (eng. *macrophage inflammator protein 1 alpha and beta*) te IL-1RA 24h nakon infekcije, opet značajno veće od razina potaknutih vakcinacijom virusom HAdV5.

Ovim je istraživanjem pokazano da inhibicija endocitoze posredovane klatrinom i infekcija virusom HAdV26 zajedno potiču značajno jači urođeni imunosni odgovor u epitelnim stanicama A549 i A549-E6 nego sama infekcija stanica ili inhibicija endocitoze *Pitstopom 2*. S obzirom na to da *Pitstop 2* zaustavlja HAdV26 ispod membrane u formiranim vezikulama, onemogućavajući njihovo unutarstanično putovanje, pretpostavka je da zaostajanje adenovirusnih čestica omogućava stanici uspješnije prepoznavanje virusa te posljedično uzrokuje veću ekspresiju gena za citokine i njihovo izlučivanje iz stanice. Dodatno, od ranije je poznato da inhibicija endocitoze posredovane klatrinom korištenjem *Pitstopa 2* povećava vezanje i ulazak virusa HAdV26 pa je pretpostavka da i to doprinosi snažnijem urođenom imunosnom odgovoru stanice na infekciju, budući da postoji veća količina liganada koje stanica svojim sensorima može prepoznati.

Istraživanja su pokazala da tijekom infekcije adenovirusi aktiviraju razne signalne puteve kojima se potiče ekspresija gena za citokine, odnosno aktivacija imunosnog odgovora stanice na infekciju. Tibbles i sur. (2001) su pokazali da vektor HAdV5 potiče ranu aktivaciju MAP

kinaza ERK i p38, u epitelnim stanicama bubrega, koja je vidljiva već 20 min nakon infekcije, a održava se i do 3h nakon infekcije. Uključenost proteina ERK i p38 u imunski odgovor stanica na infekciju virusom HAdV5 pokazana je smanjenjem ekspresije gena za kemokin IP-10 uslijed tretmana stanica s kemijskim inhibitorima proteina ERK i p38. Rezultati spomenutog rada upućuju da p38 ima važniju ulogu u ekspresiju kemokina IP-10 nego kinaza ERK, međutim, istovremena inhibicija oba proteina značajnije je smanjila ekspresiju kemokina IP-10 što vodi prema zaključku da signalni putevi p38 i ERK djeluju zajedno u stvaranju imunskog odgovora stanice na infekciju virusom HAdV5. Uključenost kinaza p38 i ERK u poticanje ekspresije kemokina IP-10, uslijed infekcije virusom HAdV5, potvrđena je i *in vivo* u miševima. Također, pokazano je i da je ekspresija kemokina IP-10, potaknuta infekcijom virusom HAdV5, neovisna o interakciji adenovirusa s površinskim receptorima CAR i integrinima, već ovisi o bijegu adenovirusa iz endosoma. Rajaiya i sur. (2008) su pokazali da infekcija stanica rožnice virusom HAdV19 dovodi do rane aktivacije kinaze p38 te do aktivacije transkripcijskog faktora NFkB za kojeg je poznato da potiče ekspresiju gena mnogih citokina. U inaktivnom stanju NFkB se nalazi u citoplazmi stanica vezan s inhibitorom IkB. Do njegove aktivacije dolazi fosforilacijom proteina NFkB i inhibitora IkB koji se zbog konformacijskih promjena više ne veže na NFkB i omogućava translokaciju transkripcijskog faktora u jezgru. Također, pokazali su da NFkB potiče ekspresiju gena za kemokin IL-8 uslijed infekcije virusom HAdV19. Inhibicijom kinaze p38 smanjena je adenovirusom potaknuta fosforilacija proteina NFkB i IkB te translokacija proteina NFkB u jezgru što pokazuje da je signalni put p38 uključen u regulaciju aktivacije ovog transkripcijskog faktora uslijed infekcije stanica virusom HAdV19. Također, korištenjem inhibitora proteina p38 utvrđeno je da adenovirusom potaknuta aktivacija signalnog puta p38 dovodi do povećane ekspresije gena za kemokin IL-8 preko aktivacije transkripcijskog faktora NFkB, te do izlučivanja ovog kemokina iz stanica. To je dodatno provjereno i potvrđeno utišavanjem kinaze p38 pomoću specifičnih RNA molekula. Korištenjem vektora HAdV2 i njegovog mutanta ts1, koji ne može pobjeći iz endosoma, Smith i sur. (2011) su pokazali da je bijeg adenovirusa u citosol bitan za aktivaciju kinaza p38 i ERK te ekspresiju citokina, međutim, pokazali su i da inhibicija ovih kinaza relativno malo smanji ekspresiju tek nekih citokina što upućuje da su za njihovu ekspresiju bitni i drugi signalni putevi.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da inhibicija endocitoze posredovane klatrinom i infekcija virusom HAdV26 dovodi do povećane aktivacije kinaze p38 u stanicama A549 i A549-E6 što je u skladu s ranije provedenim istraživanjima. S druge strane, kombinirani

tretman inhibitorom *Pitstopom 2* i infekcija virusom HAdV26 nisu utjecali na aktivaciju proteina ERK. Alcorn i sur. (2001) su pokazali da infekcija stanica A549 virusom HAdV7 potiče aktivaciju kinaze ERK i ekspresiju kemokina IL-8. Pokazano je da se aktivacija kinaze ERK događa već tijekom 5 min od infekcije, odnosno ubrzo nakon kontakta virusa HAdV7 i stanica. Najveća aktivacija proteina ERK uočena je do 10 min od infekcije, a 1h nakon infekcije količina aktiviranog oblika proteina vratila se na bazalnu, nestimuliranu razinu. S obzirom na to da sam u ovom istraživanju promatrala aktivaciju proteina ERK 1h nakon infekcije, moguće je da zbog vremenskog perioda analize nije uočen značajan utjecaj inhibicije endocitoze i infekcije na njegovu aktivaciju. Također, treba imati na umu da virusi HAdV7 i HAdV26 pripadaju različitim grupama adenovirusa te koriste različite receptore za ulazak u stanice, što posljedično uzrokuje i različito putovanje po stanici i aktivaciju različitih staničnih signalnih puteva te poticanje imunosnog odgovora stanice. Dodatno, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo dolazi li do ranije aktivacije kinaze ERK uslijed infekcije virusom HAdV26 u stanicama kojima je inhibirana endocitoza *Pitstopom 2*. Rezultati ovog rada nisu pokazali promjenu u aktivaciji transkripcijskog faktora NFkB nakon kombiniranog tretmana *Pitstopom 2* i infekcije, što navodi na zaključak da je za uočenu povećanu ekspresiju gena za citokine IL-6 i IL-8 bitan neki drugi transkripcijski faktor aktiviran signalnim putem p38.

Rezultati ovog rada otvaraju nova pitanja i smjerove istraživanja, jedno od kojih je i kako adenovirusne čestice HAdV26 zaustavljene u endocitoznim mjehurićima ispod stanične membrane bivaju prepoznate od strane stanice, odnosno kojim mehanizmom pokreću uočeni p38 signalni put i ekspresiju citokina. Kod stanica A549-E6, koje imaju povećanu ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina, tretman *Pitstopom 2* uz infekciju doveli su do značajnijeg povećanja ekspresije citokina IL-8 i aktivacije kinaze p38 u usporedbi sa stanicama A549. S obzirom na to da je pokazano da vezanje RGD motiva kapside adenovirusa za integrine na staničnoj površini pokreće signalne puteve uključene u endocitozu virusa, možemo pretpostaviti da vezanje virusa HAdV26 za $\alpha\beta3$ integrin aktivira i signalni put p38 koji dovodi do ekspresije kemokina IL-8. *In vivo* istraživanje na miševima je pokazalo da vezanje virusa HAdV5 za integrin $\beta3$ na površini makrofaga potiče povećanu ekspresiju i aktivaciju IL-1 α koji dovodi do ekspresije citokina IL-6 i kemokina IP-10, CXCL1 i CXCL2 aktivacijom signalnog puta IL-1RI (Di Paolo i sur. 2009). Dodatno, za virus herpesa (eng. *herpes simplex virus*, HSV) pokazana je važnost interakcije s integrinom $\alpha\beta3$ u pokretanju imunosnog odgovora stanice na infekciju (Gianni i sur. 2012). HSV se preko glikoproteina ovojnice veže za integrine na staničnoj površini koji, kao i kod adenovirusa, potiču ulazak virusa HSV endocitozom. Vezanje virusa HSV na integrin

$\alpha\beta 3$ pokreće signalne puteve koji dovode do ekspresije IFN tipa I te sinteze citokina preko aktivacije transkripcijskog faktora NF κ B. U istom je radu pokazano da se integrin $\alpha\beta 3$ istovremeno veže za virusne čestice HSV i za PRR receptor TLR2, te da oni zajedno pokreću signalne puteve urođene imunosti. Dodatna istraživanja potrebna su kako bi se testirala hipoteza o uključenosti integrina $\alpha\beta 3$ u aktivaciju signalnog puta p38 i ekspresiji citokina uslijed infekcije stanica virusom HAdV26 kojima je inhibirana endocitoza posredovana klatrinom.

6. ZAKLJUČCI

U skladu s definiranim ciljevima, iznosim zaključke istraživanja:

1. Inhibicija endocitoze posredovane klatrinom povećava ekspresiju gena za citokine IL-6, IL-8 i IFN- α potaknutu infekcijom stanica A549 i A549-E6 virusom HAdV26.
2. Inhibicija endocitoze posredovane klatrinom povećava lučenje proteina IL-6 i IL-8 kod stanica A549 i A549-E6 nakon infekcije virusom HAdV26.
3. Inhibicija endocitoze posredovane klatrinom i infekcija stanica A549 i A549-E6 virusom HAdV26 aktiviraju MAP kinazu p38, ali ne i MAP kinazu ERK, te pokreću signalni put koji dovodi do ekspresije pro-upalnih citokina bez aktivacije transkripcijskog faktora NF κ B.

7. LITERATURA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada.

Abbink, P., Lemckert, A. A., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Smits, S., ... & Barouch, D. H. (2007). Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *Journal of virology*, 81(9), 4654-4663.

Alcorn, M. J., Booth, J. L., Coggeshall, K. M., & Metcalf, J. P. (2001). Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *Journal of virology*, 75(14), 6450-6459.

Amstutz, B., Gastaldelli, M., Kälin, S., Imelli, N., Boucke, K., Wandeler, E., ... & Greber, U. F. (2008). Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *The EMBO journal*, 27(7), 956-969.

Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends in pharmacological sciences*, 33(8), 442-448.

Baden, L. R., Liu, J., Li, H., Johnson, J. A., Walsh, S. R., Kleinjan, J. A., ... & Barouch, D. H. (2015). Induction of HIV-1-specific mucosal immune responses following intramuscular recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 vaccination of humans. *The Journal of infectious diseases*, 211(4), 518-528.

Baker, A. T., Mundy, R. M., Davies, J. A., Rizkallah, P. J., & Parker, A. L. (2019). Human adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cell entry receptor. *Science advances*, 5(9), eaax3567.

Balka, K. R., & De Nardo, D. (2019). Understanding early TLR signaling through the Myddosome. *Journal of leukocyte biology*, 105(2), 339-351.

Barouch, D. H., Kik, S. V., Weverling, G. J., Dilan, R., King, S. L., Maxfield, L. F., ... & Goudsmit, J. (2011). International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine*, 29(32), 5203-5209.

Basner-Tschakarjan, E., Gaffal, E., O'Keeffe, M., Tormo, D., Limmer, A., Wagner, H., ... & Tüting, T. (2006). Adenovirus efficiently transduces plasmacytoid dendritic cells resulting in TLR9-dependent maturation and IFN- α production. *The Journal of Gene Medicine: A cross-*

disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications, 8(11), 1300-1306.

Bremner, K. H., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S. P., & Vallee, R. B. (2009). Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell host & microbe*, 6(6), 523-535.

Burckhardt, C. J., Suomalainen, M., Schoenenberger, P., Boucke, K., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2011). Drifting motions of the adenovirus receptor CAR and immobile integrins initiate virus uncoating and membrane lytic protein exposure. *Cell host & microbe*, 10(2), 105-117.

Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(1), 50-83.

Charman, M., Herrmann, C., & Weitzman, M. D. (2019). Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication. *FEBS letters*, 593(24), 3531-3550.

Chen, H., Xiang, Z. Q., Li, Y., Kurupati, R. K., Jia, B., Bian, A., ... & Ertl, H. C. J. (2010). Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae. *Journal of virology*, 84(20), 10522-10532.

Chen, R. F., & Lee, C. Y. (2014). Adenoviruses types, cell receptors and local innate cytokines in adenovirus infection. *International reviews of immunology*, 33(1), 45-53.

Cox, F., van der Fits, L., Abbink, P., Larocca, R. A., van Huizen, E., Saeland, E., ... & Zahn, R. (2018). 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*, 13(8), e0202820.

De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 74(2), 181-189.

Di Paolo, N. C., Miao, E. A., Iwakura, Y., Murali-Krishna, K., Aderem, A., Flavell, R. A., ... & Shayakhmetov, D. M. (2009). Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 α -mediated proinflammatory macrophage response in vivo. *Immunity*, 31(1), 110-121.

El-Zayat, S. R., Sibaii, H., & Manna, F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-12.

Fejer, G., Freudenberg, M., Greber, U. F., & Gyory, I. (2011). Adenovirus-triggered innate signalling pathways. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 1(4), 279-288.

Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., & Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature medicine*, 9(11), 1408-1412.

Geisbert, T. W., Bailey, M., Hensley, L., Asiedu, C., Geisbert, J., Stanley, D., ... & Sullivan, N. J. (2011). Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *Journal of virology*, 85(9), 4222-4233.

Gianni, T., Leoni, V., Chesnokova, L. S., Hutt-Fletcher, L. M., & Campadelli-Fiume, G. (2012). $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin is a major sensor and activator of innate immunity to herpes simplex virus-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48), 19792-19797.

Gonçalves, M. A., & de Vries, A. A. (2006). Adenovirus: from foe to friend. *Reviews in medical virology*, 16(3), 167-186.

Greber, U. F. (2002). Signalling in viral entry. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(4), 608-626.

Greber, U. F., & Flatt, J. W. (2019). Adenovirus entry: from infection to immunity. *Annual review of virology*, 6, 177-197.

Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., & Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75(3), 477-486.

Hendrickx, R., Stichling, N., Koelen, J., Kuryk, L., Lipiec, A., & Greber, U. F. (2014). Innate immunity to adenovirus. *Human gene therapy*, 25(4), 265-284.

<https://clinicaltrials.gov/> (pristupljeno 20.9.2021.)

<https://covid19.who.int/> (pristupljeno 20.9.2021.)

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (pristupljeno 20.9.2021.)

<https://www.ema.europa.eu/en> (pristupljeno 20.9.2021.)

Huarte, E., Larrea, E., Hernández-Alcoceba, R., Alfaro, C., Murillo, O., Arina, A., ... & Melero, I. (2006). Recombinant adenoviral vectors turn on the type I interferon system without inhibition of transgene expression and viral replication. *Molecular Therapy*, 14(1), 129-138.

Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(5), 313-326.

Kälin, S., Amstutz, B., Gastaldelli, M., Wolfrum, N., Boucke, K., Havenga, M., ... & Greber, U. F. (2010). Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *Journal of virology*, 84(10), 5336-5350.

Kasel, J. A., EVANS, H. E., Spickard, A., & Knight, V. (1963). Conjunctivitis and enteric infection with adenovirus types 26 and 27: responses to primary, secondary and reciprocal cross-challenges. *American Journal of Epidemiology*, 77(3), 265-282.

Khan, S., Oosterhuis, K., Wunderlich, K., Bunnik, E. M., Bhaggoe, M., Boedhoe, S., ... & Custers, J. (2017). Development of a replication-deficient adenoviral vector-based vaccine candidate for the interception of HPV16-and HPV18-induced infections and disease. *International journal of Cancer*, 141(2), 393-404.

Lee, J. S., Mukherjee, S., Lee, J. Y., Saha, A., Chodosh, J., Painter, D. F., & Rajaiya, J. (2020). Entry of epidemic keratoconjunctivitis-associated human adenovirus type 37 in human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(10), 50-50.

Leopold, P. L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K. K., Rodriguez-Boulan, E., & Crystal, R. G. (2000). Dynein-and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Human gene therapy*, 11(1), 151-165.

Li, E., Stupack, D., Bokoch, G. M., & Nemerow, G. R. (1998). Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *Journal of virology*, 72(11), 8806-8812.

Li, H., Rhee, E. G., Masek-Hammerman, K., Teigler, J. E., Abbink, P., & Barouch, D. H. (2012). Adenovirus serotype 26 utilizes CD46 as a primary cellular receptor and only transiently activates T lymphocytes following vaccination of rhesus monkeys. *Journal of virology*, 86(19), 10862-10865.

Lion, T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 441-462.

Luisoni, S., & Greber, U. F. (2016). Biology of adenovirus cell entry: receptors, pathways, mechanisms. U: Curiel, D. T. (ur.) (2016). Adenoviral vectors for gene therapy. *New York/London: Academic Press*, str.27-58.

Majhen, D., Calderon, H., Chandra, N., Fajardo, C. A., Rajan, A., Alemany, R., & Custers, J. (2014). Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field. *Human gene therapy*, 25(4), 301-317.

Mast, T. C., Kierstead, L., Gupta, S. B., Nikas, A. A., Kallas, E. G., Novitsky, V., ... & Shiver, J. W. (2010). International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine*, 28(4), 950-957.

McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8), 517-533.

Medina-Kauwe, L. K. (2003). Endocytosis of adenovirus and adenovirus capsid proteins. *Advanced drug delivery reviews*, 55(11), 1485-1496.

Meier, O., & Greber, U. F. (2004). Adenovirus endocytosis. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 6(S1), S152-S163.

Meier, O., Boucke, K., Hammer, S. V., Keller, S., Stidwill, R. P., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *The Journal of cell biology*, 158(6), 1119-1131.

Mercer, J., Schelhaas, M., & Helenius, A. (2010). Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 79, 803-833.

Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2018). Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 87, 871-896.

Muruve, D. A. (2004). The innate immune response to adenovirus vectors. *Human gene therapy*, 15(12), 1157-1166.

Nedelman, M. (2018). 11th child dies in adenovirus outbreak in New Jersey. *CNN. com*.

Nemerow, G. R., Pache, L., Reddy, V., & Stewart, P. L. (2009). Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*, 384(2), 380-388.

Nestić, D., Uil, T. G., Ma, J., Roy, S., Vellinga, J., Baker, A. H., ... & Majhen, D. (2019). $\alpha\beta3$ integrin is required for efficient infection of epithelial cells with human adenovirus type 26. *Journal of virology*, 93(1), e01474-18.

Nilsson, E. C., Storm, R. J., Bauer, J., Johansson, S. M., Lookene, A., Ångström, J., ... & Arnberg, N. (2011). The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nature medicine*, 17(1), 105-109.

Rajaiya, J., Xiao, J., Rajala, R. V., & Chodosh, J. (2008). Human adenovirus type 19 infection of corneal cells induces p38 MAPK-dependent interleukin-8 expression. *Virology journal*, 5(1), 1-11.

Rosen, L., Baron, S., & Bell, J. A. (1961). Four newly recognized adenoviruses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 107(2), 434-437.

Scherer, J., & Vallee, R. B. (2015). Conformational changes in the adenovirus hexon subunit responsible for regulating cytoplasmic dynein recruitment. *Journal of virology*, 89(2), 1013-1023.

Smith, J. S., Xu, Z., Tian, J., Palmer, D. J., Ng, P., & Byrnes, A. P. (2011). The role of endosomal escape and mitogen-activated protein kinases in adenoviral activation of the innate immune response. *PloS one*, 6(10), e26755.

Stasiak, A. C., & Stehle, T. (2020). Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view. *Medical microbiology and immunology*, 209(3), 325-333.

Strunze, S., Engelke, M. F., Wang, I. H., Puntener, D., Boucke, K., Schleich, S., ... & Greber, U. F. (2011). Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell host & microbe*, 10(3), 210-223.

Suomalainen, M., Luisoni, S., Boucke, K., Bianchi, S., Engel, D. A., & Greber, U. F. (2013). A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells. *Journal of virology*, 87(22), 12367-12379.

Svensson, U. (1985). Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells. *Journal of virology*, 55(2), 442-449.

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.

Teigler, J. E., Iampietro, M. J., & Barouch, D. H. (2012). Vaccination with adenovirus serotypes 35, 26, and 48 elicits higher levels of innate cytokine responses than adenovirus serotype 5 in rhesus monkeys. *Journal of virology*, 86(18), 9590-9598.

Tibbles, L. A., Spurrell, J. C., Bowen, G. P., Liu, Q., Lam, M., Zaiss, A. K., ... & Muruve, D. A. (2002). Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the CXC chemokine IP-10. *Journal of virology*, 76(4), 1559-1568.

Von Kleist, L., Stahlschmidt, W., Bulut, H., Gromova, K., Puchkov, D., Robertson, M. J., ... & Haucke, V. (2011). Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*, 146(3), 471-484.

Wang, H., Li, Z. Y., Liu, Y., Persson, J., Beyer, I., Möller, T., ... & Lieber, A. (2011). Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nature medicine*, 17(1), 96-104.

Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A., & Nemerow, G. (1998). Adenovirus internalization and infection require dynamin. *Journal of virology*, 72(4), 3455-3458.

Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73(2), 309-319.

Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L., & Nemerow, G. R. (2005). Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *Journal of virology*, 79(4), 1992-2000.

Wu, W., Booth, J. L., Duggan, E. S., Patel, K. B., Coggeshall, K. M., & Metcalf, J. P. (2010). Human lung innate immune cytokine response to adenovirus type 7. *The Journal of general virology*, 91(Pt 5), 1155. Alcorn, M. J., Booth, J. L., Coggeshall, K. M., & Metcalf, J. P. (2001). Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *Journal of virology*, 75(14), 6450-6459.

Yarar, D., Waterman-Storer, C. M., & Schmid, S. L. (2005). A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell*, 16(2), 964-975.

Yousuf, M. A., Zhou, X., Mukherjee, S., Chintakuntlawar, A. V., Lee, J. Y., Ramke, M., ... & Rajaiya, J. (2013). Caveolin-1 associated adenovirus entry into human corneal cells. *PLoS One*, 8(10), e77462.

Yu, X., Veessler, D., Campbell, M. G., Barry, M. E., Asturias, F. J., Barry, M. A., & Reddy, V. S. (2017). Cryo-EM structure of human adenovirus D26 reveals the conservation of structural organization among human adenoviruses. *Science advances*, 3(5), e1602670.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 5. 2. 1998. Pohađala sam Osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića te Gimnaziju Tituša Brezovačkog u Zagrebu. Godine 2016. upisala sam preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Prigodom Dana Fakulteta 2019. godine dodijeljena mi je pohvalnica za izuzetan uspjeh u studiju. Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2019. godine. Uspješno sam položila tečaj za osposobljavanje osoba koje rade sa pokusnim životinjama A kategorije. Laboratorijsku stručnu praksu odradila sam u Jedinici za znanstvena istraživanja Klinike za infektivne bolesti Dr. Fran Mihaljević u Zagrebu. Tijekom studiranja sudjelovala sam u organiziranju „Noći biologije“, volontirala sam u Zoološkom vrtu Grada Zagreba te u Nacionalnom parku Plitvička jezera u sklopu programa „Zeleni čuvar“. Tijekom svih godina studiranja zbog uspjeha na studiju primala sam Stipendiju Grada Zagreba za izvrsnost.