

Priprema adenovirusnih vektora za unos gena TLR5 u stanice pluća

Krasnić, Vanessa

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:157144>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Vanessa Krasnić

Priprema adenovirusnih vektora za unos gena *TLR5* u stanice pluća

Diplomski rad

Zagreb, 2019. godina

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Vanessa Krasnić

Priprema adenovirusnih vektora za unos gena *TLR5* u stanice pluća

Diplomski rad

Zagreb, 2019. godina

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za naprednu genomiku, na Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Jelene Knežević, više znanstvene suradnice na IRB-u. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Jeleni Knežević i suvoditeljici prof. dr. sc. Nadi Oršolić koje su mi omogućile izradu ovog diplomskog rada.

Prvenstveno zahvaljujem dr. sc. Jeleni Knežević što mi je pružila mogućnost izrade ovog diplomskog rada na IRB-u.

Zahvaljujem dr. sc. Dragomiri Majhen na savjetima i mogućnosti izrade djela eksperimenata u laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala na IRB-u.

Veliko hvala doktorandici Matei Kurtović na vodstvu kroz eksperimentalni kao i pismeni dio rada. Hvala i doktorandici Maji kao i doktorandu Davoru na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog djela rada u laboratoriju.

Zahvaljujem Marinu na svim porukama utjehe u kasnim ponoćnim satima i na ramenu za plakanje kada mi je to bilo najpotrebnije, kao i na informatičkim sposobnostima koje su mi dobro došle.

Puno hvala mami i tati koji su uvijek tu i koji su svojom ljubavlju i nesebičnim davanjem učinili da sve ovo bude moguće. Također hvala Sabrini i Josipu što su tu uz mene kada god je potrebno.

Ovaj rad posvećujem osobi koja više nije ovdje, a koja je prva pustila suzu kada sam ukoračila u svijet fakultetskog obrazovanja, najdraža osobo nadam se da ćeš gdje god da jesi pustiti suzu i kada ono završi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Priprema adenovirusnih vektora za unos gena *TLR5* u stanice pluća

Vanessa Krasnić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) i rak pluća značajni su uzročnici smrtnosti u svijetu. Izloženost duhanskom dimu predstavlja glavni čimbenik razvoja KOPB-a. Epidemiološka istraživanja pokazala su da je KOPB, neovisno o statusu pušenja, najveći čimbenik rizika za razvoj raka pluća. Genetička podloga povezanosti ovih patoloških entiteta je nepoznata. U održavanju homeostaze organizma važnu ulogu ima regulacija imunogenog odgovora. Bitnu ulogu u pokretanju imunosti imaju toll-like receptori (TLR) tako što prepoznaju patogene pridružene slijedove i induciraju signalne puteve u domaćinu kao antimikrobni odgovor. Ranija istraživanja su pokazala da je genetička varijanta gena *TLR5*, N592S, povezana s nastankom KOPB-a i raka pluća. Cilj ovog istraživanja je konstruirati replikacijski defektan adenovirusni vektor uvođenjem gena za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}* u okosnicu adenovirusa tipa 5 (Ad5) koji bi omogućio unos tog gena u modelni organizam, u ovom slučaju humane stanice pluća (A549, WI38 i H1299), u svrhu daljnjih funkcionalnih istraživanja. Rekombinantni Ad5-*TLR5* virus konstruiran je manipulacijom Ad5 genoma kao plazmida u *E. coli* korištenjem homologne rekombinacije u bakterijskom soju BJ5183. Ad5-*TLR5^{wt}* i Ad5-*TLR5^{N592S}* umnoženi su u humanim embrionalnim stanicama bubrega 293 (HEK293) i pročišćeni ultracentrifugiranjem u gradijentu cezijeveog klorida.

(70 stranica, 22 slike, 9 tablica, 82 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Kronična opstruktivna plućna bolest, rak pluća, gen *TLR5*, kloniranje, adenovirusni vektori

Voditelj: Dr. sc. Jelena Knežević, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić,

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić,

Prof. dr. sc. Maria Špoljar

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Preparation of adenoviral vectors for insertion of the *TLR5* gene into lung cells

Vanessa Krasnić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung cancer are major causes of death in the world. Exposure to tobacco smoke presents the main factor in the development of COPD. Epidemiological research has shown that COPD represents, regardless of smoking status, the biggest risk factor for developing lung cancer. The genetic basis of the association of these pathological entities is unknown. The regulation of the immune response plays an important role in maintaining homeostasis. Toll-like receptors (TLR) are important for initiating immunity by recognising the sequences associated with the pathogen and inducing signal pathways in the host as an antimicrobial response. Previous researches have shown that the genetic variant of *TLR5*, N592S gene, is associated with COPD and lung cancer. The aim of this research was to construct a replication-defective adenoviral vector by introducing a gene for *TLR5*^{wt} and *TLR5*^{N592S} into the adenovirus type 5 (Ad5) backbone that would allow the insertion of this gene into a model organism, in this case human lung cells (A549, WI38 and H1299), for the purpose of further functional research. Recombinant Ad5-*TLR5* virus was constructed by manipulating the Ad5 genome as a plasmid in *E. coli* using homologous recombination in bacterial strain BJ5183. Ad5-*TLR5*^{wt} and Ad5-*TLR5*^{N592S} were amplified in human embryonic kidney cells 293 (HEK293) and purified by ultracentrifugation in the caesium chloride gradient.

(70 pages, 22 figures, 9 tables, 82 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease, lung cancer, *TLR5* gene, cloning, adenoviral vectors

Supervisor: Dr. sc. Jelena Knežević, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute

Co-supervisor: Prof. Nada Oršolić, PhD, Professor

Reviewers: Prof. dr. sc. Nada Oršolić,

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić,

Prof. dr. sc. Maria Špoljar

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) i rak pluća.....	1
1.2. Imunosni sustav	2
1.3. <i>Toll-like receptori</i> (TLR)	3
1.3.1. Prijenos signala putem toll-like receptora	4
1.3.2. Toll-like receptor 5 (TLR5).....	5
1.3.3. Polimorfizmi u genima TLR.....	6
1.4. Tehnologija rekombinantne DNA.....	7
1.5. Adenovirusi i njihova građa.....	7
1.5.2. Životni ciklus adenovirusa Ad5.....	9
1.5.1. Genom adenovirusa tipa 5 (Ad5)	10
1.5.3. Replikacija adenovirusa	10
1.5.4. Adenovirusni vektori prve generacije	11
2. CILJ RADA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Stanice.....	13
3.1.1.1. Bakterijske stanice	13
3.1.1.2. Humane stanice	13
3.1.2. Hranjivi mediji	13
3.1.3. Sastav i priprema otopina.....	14
3.1.4. Komercijalni kompleti	15
3.1.5. Enzimi i antitijela.....	15
3.1.6. Osnovne kemikalije	15
3.1.5. Plazmidi	16
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Priprema vektora pShuttle-CMV za ligaciju.....	18
3.2.1.1. Određivanje masene koncentracije vektora pShuttle-CMV	18
3.2.1.2. Razgradnja vektora pShuttle-CMV restriksijskom endonukleazom <i>EcoRV</i>	18
3.2.1.3. Precipitacija, defosforilacija i pročišćavanje vektora pShuttle-CMV	18
3.2.2. Izolacija inserata <i>TLR5^{wt}</i> i <i>TLR5^{N592S}</i> za ligaciju	19
3.2.2.1. Izrezivanje inserata iz ekspresijskih klonova restriksijskom endonukleazom <i>PmeI</i>	19

3.2.2.2. Agarozna gel-elektroforeza.....	19
3.2.2.3. Pročišćavanje <i>TLR5</i> inserata.....	20
3.2.3. Ligacija inserata <i>TLR5^{wt}</i> i <i>TLR5^{N592S}</i> u vektor pShuttle-CMV.....	20
3.2.4. Transformacija kompetentnih bakterija <i>Escherichia coli</i> DH5- α temperaturnim šokom.....	21
3.2.5. Izolacija plazmidne DNA.....	22
3.2.6. Lančana reakcija polimerazom.....	22
3.2.7. Razgradnja uzoraka restrikcijskim endonukleazama <i>PmeI</i> i <i>BamHI</i>	24
3.2.8. Izolacija plazmidne DNA metodom mini-prep.....	24
3.2.9. Izolacija plazmidne DNA metodom midi-prep.....	24
3.2.10. Potvrda ispravne orijentacije inserta koji kodira gen za <i>TLR5</i>	24
3.2.11. Razgradnja konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 restrikcijskom endonukleazom <i>PmeI</i>	26
3.2.12. Transformacija kompetentnih bakterija <i>Escherichia coli</i> BJ5183-AD-1 elektroporacijom.....	26
3.2.13. Transformacija kompetentnih bakterija <i>Escherichia coli</i> DH5- α temperaturnim šokom.....	27
3.2.14. Razgradnja konstrukata Ad5-TLR5 restrikcijskom endonukleazom <i>EcoRV</i>	27
3.2.15. Razgradnja uzoraka restrikcijskom endonukleazom <i>PacI</i>	28
3.2.16. Transfekcija HEK-293 stanica s adenovirusnim konstruktom.....	28
3.2.17. Pročišćavanje adenovirusnih vektora.....	30
3.2.18. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa.....	31
3.2.19. Zaražavanje stanica A549, WI38 i H1299.....	32
3.2.20. <i>Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a (SDS-PAGE)</i>	32
3.2.21. Analiza Western blot.....	33
4. REZULTATI.....	36
4.1. Priprema inserata <i>TLR5^{wt}</i> i <i>TLR5^{N592S}</i> za kloniranje u vektor pShuttle-CMV.....	36
4.2. Metoda ligacije i amplifikacije ligiranih produkata.....	36
4.3. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	38
4.4. Razgradnja konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 restrikcijskim enzimima <i>PmeI</i> i <i>BamHI</i>	40
4.5. Provjera ligacije inserata <i>TLR5^{wt}</i> i <i>TLR5^{N592S}</i> s vektorom pShuttle-CMV.....	42
4.6. Homologna rekombinacija u svrhu dobivanja rekombinantnih virusa.....	43
4.7. Povrda uspješne homologne rekombinacije.....	45
4.8. Dobivanje, umnažanje i pročišćavanje virusnih čestica Ad5-TLR5 ^{wt} i Ad5-TLR5 ^{N592S}	46
4.9. Unos gena <i>TLR5^{wt}</i> i <i>TLR5^{N592S}</i> u humane stanice pluća.....	48
4.10. Western blot analiza ekspresije proteina TLR5.....	48
5. RASPRAVA.....	51

6.	ZAKLJUČAK.....	54
7.	LITERATURA	55
8.	Životopis	63

1. UVOD

1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) i rak pluća

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) četvrti je glavni uzročnik kroničnog morbiditeta i smrtnosti u cijelom svijetu (Pauwels i sur. 2001). Glavne karakteristike vezane uz KOPB su ireverzibilna opstrukcija protoka zraka i trajna upala (Kim i Criner 2013).

Prva istraživanja bila su usmjerena na pušenje kao najvažniji čimbenik rizika za KOPB. Međutim rezultati velikog broja objavljenih istraživanja sugeriraju da su čimbenici rizika neovisni o pušenju snažno povezani s KOPB-om. Ti čimbenici uključuju izlaganje onečišćenom zraku, dugotrajnu izloženost prašini i dimu, ponavljajuće infekcije donjeg respiratornog sustava tijekom djetinjstva, plućne tuberkuloze, kroničnu astmu, intrauterini zastoje rasta, lošu prehranu i loš socioekonomski status (Salvi i Barnes 2009).

Istraživanja su pokazala kako antigene kemikalije cigaretnog dima mogu dovesti do razvoja kompleksa antigen-antitijelo koji potencijalno može inducirati plućne ozljede (Arcavi i Benowitz 2004). Takvi kompleksi mogu uzrokovati plućne i periferne promjene imunskog sastava slinice i bronhoalveolarne tekućine koje povećavaju osjetljivost na infekcije respiratornog sustava (Hersey i sur. 1983). Djelovanje nikotina kao najvažnije imunosupresivne komponente cigaretnog dima (Arcavi i Benowitz 2004) može potaknuti oslobađanje kateholamina i kortikosteroida koji mogu povećati broj CD8⁺ limfocita u staničnom sustavu i suzbiti obranu domaćina od infekcija (Miller i sur. 1982). Inducirana sustavna upala zbog pušenja cigareta karakterizira povećanje u cirkulirajućim upalnim molekulama kao što su proupalni citokini. Nekoliko istraživanja izvijestilo je da pušenje može uzrokovati povišene razine TNF-a (engl. *tumor necrosis factor*), TNF receptora, interleukina 1 (IL-1), IL-6, IL-8 i granulocit-makrofagnih čimbenika (Bermudez i sur. 2002, Glossop i sur. 2006, Churg i sur. 2009).

Rak pluća je maligna bolest koja se tradicionalno klasificira u dva tipa, karcinom pluća ne-malih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) i karcinom pluća malih stanica (engl. *small cell lung cancer*, SCLC) (Durham i Adcock 2015). Rizik od raka pluća kod pušača je 17,2% za muškarce i 11,6% za žene u usporedbi s 1,3% i 1,4% za nepušače (Villeneuve i Mao 1994). Rak pluća je uzrokovan mutacijama koje dovode do proliferacije mutiranih stanica i stvaranja tumora (Durham i Adcock 2015).

Zajednički uzročni čimbenik KOPB-a i raka pluća je pušenje cigareta. Međutim iako cigaretni dim predstavlja najveću opasnost za oboljeljenje od raka, mnogi pušači nikada neće razviti ovu bolest (Turner i sur. 2007) dok postoje slučajevi kod kojih se rak pluća razvija kod nepušača (Thun i sur. 2006). Ovi podaci upućuju na važnost genetičke podloge za razvoj raka pluća. KOPB je čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća, a posebno karcinoma pločastih stanica (Papi i sur. 2004) što povećava vjerojatnost čak i do pet puta za razvijanje bolesti kod pušača s opstrukcijom protoka zraka u odnosu na ljude s normalnom funkcijom pluća (Houghton 2013).

1.2. Imunosni sustav

Poznato je kako se obrana domaćina protiv patogena oslanja na urođene i stečene komponente (Hoffmann i sur. 1999). Imunosni odgovor može biti nespecifičan i kao takav pripada urođenoj imunosti, a ukoliko je specifičan pripada stečenoj imunosti. U urođenom imunosnom odgovoru kao prvoj liniji obrane posreduju imunosne stanice perifernih tkiva kao što su monociti, neutrofil, makrofagi, dendritičke stanice, T stanice, B stanice i NK stanice (engl. *Natural killer cells*). Primarni izazov urođenom imunosnom sustavu je diskriminacija velikog broja potencijalnih patogena od vlastitih stanica uz upotrebu ograničenog broja receptora (Aderem i Ulevitch 2000). Posljedično tomu dolazi do predstavljanja komponenti patogena T stanicama i aktivacije stečenog imunosnog odgovora te uspostave zaštitnog imuniteta (Aderem i Underhill 1999). Stečena imunost je uključena u uklanjanje patogena u kasnoj fazi infekcije kao i u stvaranju imunosne memorije (Akira i sur. 2006). Receptori urođene imunosti prepoznaju određene molekularne uzorke na površini patogeničnih bakterija (PAMP, prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*) pa im otuda i naziv receptori za prepoznavanje uzorka (PRR, prema engl. *pattern recognition receptors*) (Malenica 2005).

Bitnu ulogu u indukciji urođene imunosti, a time i pokretanju stečene imunosti igraju toll-like receptori (TLR) tako što prepoznaju i diskriminiraju gljivice i bakterije inducirajući odgovarajuće signalne puteve u domaćinu kao antimikrobni odgovor (Aderem i Ulevitch 2000, Akira i sur. 2001). Receptori TLR se uglavnom eksprimiraju u ljudskim imunosnim stanicama, kao što su monociti, neutrofil, makrofagi, dendritičke stanice, T stanice, B stanice i NK stanice. U tim stanicama angažman receptora TLR s prepoznatim ligandima izvedenim iz patogenih organizama izazivaju urođeni imunosni odgovor. Epitel je prva linija u obrani protiv invazije mikroorganizama

i mjesto ekspresije receptora TLR koji imaju ključnu ulogu u obrani protiv mikroorganizama prepoznavanjem konzerviranih bakterijskih molekula (Yu i Chen 2008).

1.3. *Toll-like receptori* (TLR)

Otkriće receptora TLR revolucionarni je događaj u znanosti i medicinskim istraživanjima te pomaže u poboljšanju razumijevanja uloge urođene imunosti u fiziologiji i patologiji ljudskog zdravlja, a samim time i pokretanju stečenog imunskog odgovora (Akira i sur. 2001).

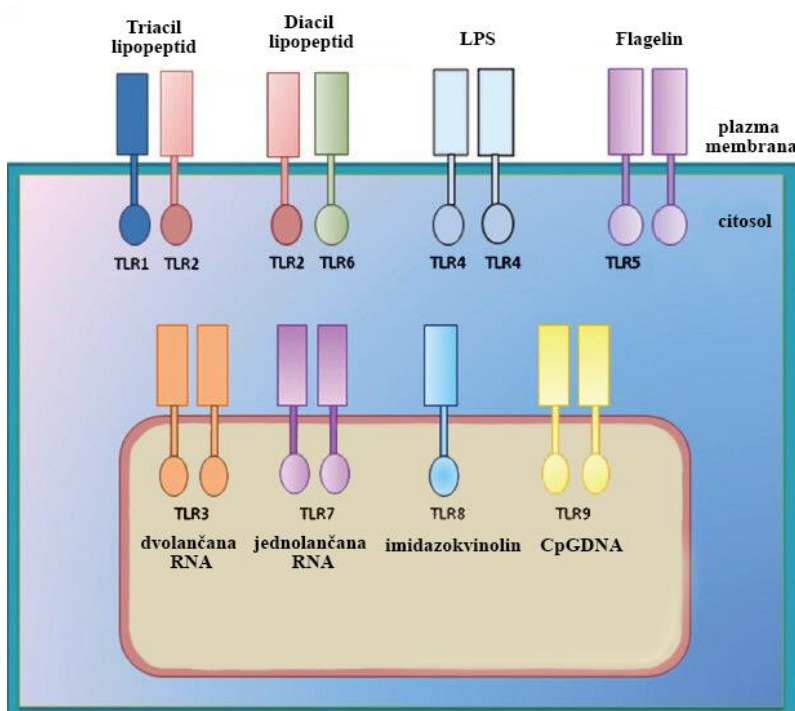
Prvi receptor TLR otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) gdje mu je opisana ključna uloga u embrionalnom razvoju u dorzo-ventralnoj polarnosti kao i obrani organizma od gljivičnih infekcija (Anderson i sur. 1985). Na početku se smatralo kako su receptori TLR eksprimirani samo u imunskim stanicama, ali danas postoji sve veći broj dokaza koji ukazuju na to da su neki receptori TLR osjetljivi na produkte oštećenog tkiva (Chen i sur. 2007, Cook i sur. 2004). Oštećeno tkivo kao takvo izaziva upalu, stoga je hipoteza da receptori TLR iniciraju upalni odgovor na bolesti kao što su npr. aterogeneza, dijabetes pa čak i rak (O'Neill i sur. 2009, Dekleijn i Pasterkamp 2003, Kim 2006).

Receptori TLR su transmembranski proteini koji se sastoje od izvanstanične regije N-terminalnog ponavljanja bogatog leucinom (engl. *Leucine-rich repeat*), transmembranske domene i C-terminalne citoplazmatske domene slične citoplazmatskoj domeni receptora IL-1 poznate kao TIR (Toll/IL1) domena. TIR domena je odgovorna za aktiviranje nizvodnih signalnih puteva (Kawai i Akira 2007). Do sada je identificirano 10 funkcionalnih receptora TLR kod ljudi i 12 kod miševa. Receptor TLR10 je funkcionalan jedino kod ljudi dok je receptor TLR11 funkcionalan jedino kod miševa.

S obzirom na staničnu lokalizaciju i ligande koje prepoznaju receptori TLR su podijeljeni u dvije podskupine. Jedna se podskupina sastoji od receptora TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR11 koji su izraženi na staničnim površinama i prepoznaju uglavnom mikrobne membranske komponente kao što su lipidi, lipoproteini i proteini, a druga se podskupina sastoji od receptora TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 koji se eksprimiraju isključivo u unutarstaničnim vezikulama kao što su endoplazmatski retikulum (ER), endosomi, lizosomi i endolizosomi gdje prepoznaju nukleinske kiseline mikrobnog podrijetla (Kawai i Akira 2010) (Slika 1).

Receptori TLR2 i TLR4 su uključeni u prepoznavanje različitih komponenti bakterijskih staničnih stijenki poput lipopolisaharida (Takeuchi i sur. 1999) dok je ssRNA fiziološki ligand za TLR7 i TLR8 (Heil i sur. 2004). Receptor TLR3 sisavaca prepoznaje dsRNA (Alexopoulou i sur. 2001).

Receptor TLR5 sisavaca prepoznaje bakterijski flagelin iz Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a njegova aktivacija mobilizira nuklearni čimbenik NF- κ B i stimulira proizvodnju čimbenika nekroze tumora-alfa (TNF- α) (Hayashi i sur. 2001).



Slika 1: *Toll-like* receptori i njihovi ligandi (preuzeto i prilagođeno prema Pandey i sur. 2013).

1.3.1. Prijenos signala putem toll-like receptora

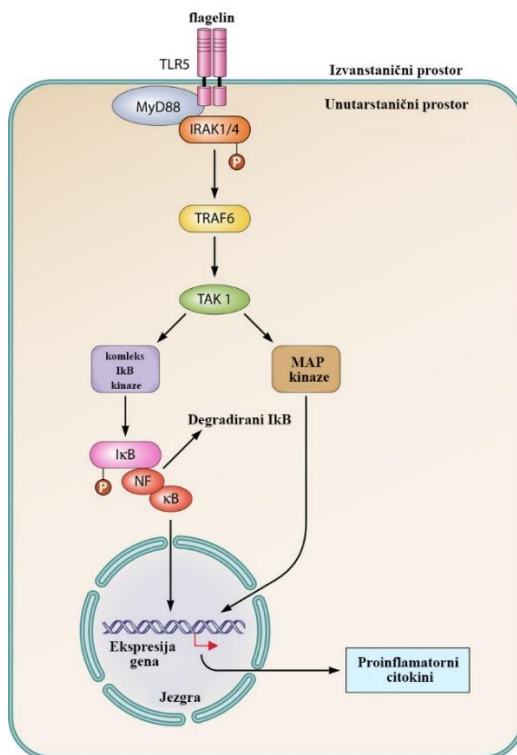
Stimulacija stanica s ligandima koje prepoznaju receptori TLR regrutira adapter protein koji sadrži TIR domenu kao što je mijeloidni diferencijacijski čimbenik 88 (engl. *Myeloid differentiation primary response gene 88*, MyD88). Vezanjem molekule MyD88 omogućava se aktivacija (fosforilizacija) molekule IRAK-4 (engl. *interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) čija je domena smrti u interakciji s domenom smrti MyD88. Aktivacijom, IRAK-4 zatim aktivira i fosforilira IRAK-1 koji kao takav aktivira Traf-6 (engl. *TNF receptor associated family 6*). Zatim dolazi do niza reakcija ubikvitinilacije Traf-6, protein kinaze TAK-1 (engl. *Transforming growth factor- β -activated protein kinase 1*) koja ima mogućnost fosforilacije kompleksa I κ B kinaze (IKK)

što dovodi do oslobađanja NF- κ B i njegove translokacije u jezgru (O'Neill 2006). Aktivacija NF κ B omogućuje transkripciju imunomodulacijskog sustava gena, uključujući gene za različite citokine i kemokine (Slika 2) (Akira i sur. 2006). Proizvodnja citokina i kemokina zauzvrat aktivira upalu kroz regrutiranje imunskih stanica domaćina i aktivaciju antimikrobnih obrana (McInturff i sur. 2005).

1.3.2. Toll-like receptor 5 (TLR5)

Receptor TLR5 je član obitelji TLR koji se eksprimira na staničnoj površini, a sadrži izvanstaničnu domenu bogatu leucinom, transmembransku domenu i citoplazmatsku domenu (Hayashi i sur. 2001, Pandey i sur. 2013). Gen koji kodira za receptor *TLR5* lokaliziran je na kromosomu 1, na mjestu 1q33.3. i sadrži pet egzona (Trejo-de la O i sur. 2014). Flagelin, glavna komponenta bakterijske flagele predstavlja ligand za receptor TLR5 (Song i sur. 2017). Flagelinske molekule iz različitih bakterija imaju hipervarijabilnu središnju domenu i konzervirane N- i C- krajeve važne za stvaranje protofilamenata i pokretljivost (Bardoel i sur. 2011).

Vežanje flagelina na receptor TLR5 aktivira put koji ovisi o MyD88 (Gupta i sur. 2014), a čime se pokreće prijenos signala putem receptora TLR5 koji je shematski prikazan na Slici 2.



Slika 2: Prijenos signala putem receptora TLR5 (preuzeto i prilagođeno iz Gupta i sur. 2014).

1.3.3. Polimorfizmi u genima TLR

Opsežne analize receptora TLR otkrile su njihovu specifičnost u prepoznavanju liganada, ekspresiji u različitim stanicama i tkivima i što je najvažnije njihovu ulogu u patogenezi višestrukih bolesti povezanih s urođenim i stečenim imunim sustavom (O'Neill i sur. 2009).

Mnoga su izvješća ukazala na to da se genetske varijacije u TLR genima odnose na osjetljivost na bolesti. Sposobnost pravilnog reagiranja na TLR ligande može biti narušena pojedinačnim nukleotidnim polimorfizmima (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) unutar TLR gena. Poznato je nekoliko SNP-ova u ljudskim genima za TLR (TLR1-10), a izvještaji su također predložili da ti SNP-ovi imaju funkcionalni utjecaj i medicinsku važnost za širok raspon ljudskih bolesti (Trejo-de la O i sur. 2014). Istraživanja su pokazala kako specifični polimorfizmi gena koji kodiraju receptore TLR ili njihove signalne molekule mogu razjasniti odnose između TLR signalizacije i ljudske bolesti (Cook i sur. 2004). Do sada, najbolje istražen TLR polimorfizam je supstitucija asparaginske kiseline s glicinom na položaju 299 (D299G) kod receptora TLR4 (Arbour i sur. 2000). Ovaj polimorfizam identificiran je zbog povezanosti sa smanjenim odgovorom dišnih putova na inhalirani bakterijski lipopolisaharid (LPS) kod ljudi i odgovarajućim smanjenim signalnim odgovorom na lipopolisaharid *in vitro* (Shuang i sur. 2017). Polimorfizam D299G povećava rizik od zaraze Gram-negativnim bakterijama i razvoj sepse, a osim toga povezan je s povećanim rizikom od malarije, aspergiloze, respiratornog sincicijskog virusa i razvoja bronholitisa.

Poznato je da polimorfizam Arg753Gln na receptoru TLR2 narušava nizvodnu signalizaciju i povezan je s osjetljivošću na tuberkulozu dok polimorfizam Thr1486Cys na receptoru TLR9 povećava rizik od malarije (Kawai i Akira 2011).

U kodirajućem slijedu receptora TLR5 otkriveno je pet istovjetnih odnosno tih mutacija i 13 pogrešnih (engl. *missence*) mutacija (Merx i sur. 2006). Polimorfizam na receptoru TLR5, Arg393STOP, koji uzrokuje preuranjeni STOP kodon povezan je s osjetljivošću na legionarsku bolest (Kawai i Akira 2011). Drugi uobičajeni SNP u genu koji kodira za *TLR5* je rs2072493/N592S i nalazi se u izvanstaničnoj domeni receptora TLR5 (Shuang i sur. 2017). Ovaj je SNP povezan s ukupnim preživljenjem ispitanika koji boluju od kolorektalnog karcinoma u velikoj skupini ljudi koji pripadaju bijeloj rasi (Klimosch i sur. 2013).

1.4. Tehnologija rekombinantne DNA

Tehnologija rekombinantne DNA je kloniranje djelova DNA, tj. stvaranje mnogobrojnih kopija DNA putem replikacije u prokariotskoj ili eukariotskoj stanici. U genetičkom inženjerstvu najčešće korišteni organizam u kloniranju je bakterija *Escherichia coli*. Prokariotske stanice ne sadrže enzime za posttranslacijsku i posttranskripcijsku modifikaciju pa se za ekspresiju nekih eukariotskih gena moraju koristiti eukariotski vektori.

Ova tehnika omogućuje konstrukciju novih, rekombinantnih molekula DNA kombinacijom dvaju ili više različitih fragmenata DNA. Kloniranje DNA fragmenata započinje izoliranjem molekule DNA koja se potom fragmentira na određenu duljinu pomoću restrikcijskih enzima. Restrikcijske endonukleaze tipa II prepoznaju specifičan slijed nukleotida tzv. palindromske slijedove na čijim mjestima potom hidroliziraju fosfodieterske veze i ostavljaju tupe ili stršće krajeve. Sljedeći korak predstavlja konstrukciju rekombinantne molekule DNA ugradnjom željenog inserta u vektor. Važno je da su krajevi inserta i vektora isti, primjerice ukoliko insert sadrži ravne krajeve i vektor mora imati ravne krajeve kako bi DNA-ligaza mogla stvoriti fosfodietersku vezu. Vektori sadrže dvolančanu molekulu DNA, a najčešće su to plazmidi bakterija ili kvasaca, bakterijski i animalni virusi. Nakon konstrukcije, rekombinantnom DNA molekulom vrši se transformacija kompetentnih bakterijskih stanica ili transfekcija eukariotskih stanica. Uspješan prijenos DNA od interesa u stanicu domaćina rezultira amplifikacijom rekombinantnih molekula DNA (<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl20.html>).

Ovaj rad će se baviti kloniranjem DNA slijedova koji kodiraju za gene $TLR5^{wt}$ i $TLR5^{N592S}$ u vektor pShuttle-CMV u svrhu konstrukcije rekombinantne DNA molekule. Za ekspresiju gena koji kodiraju receptor $TLR5^{wt}$ kao i $TLR5^{N592S}$ koristit će se replikacijski defektni adenovirusni vektori.

1.5. Adenovirusi i njihova građa

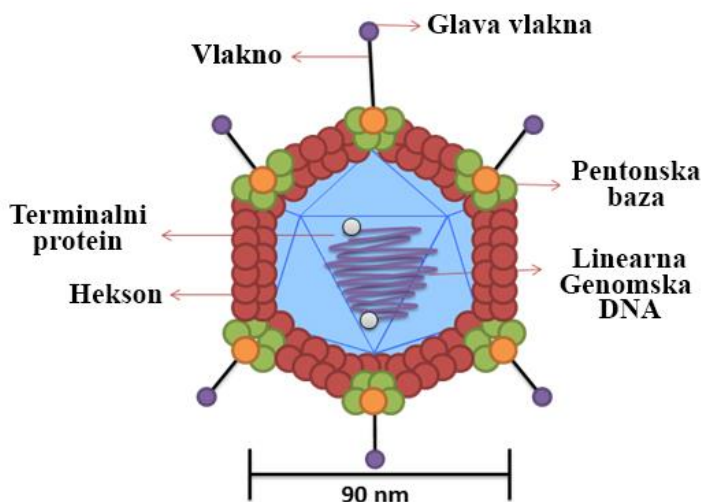
Rowe i sur. prvi su otkrili adenovirus (Ad) 1953. godine pokušavajući kultivirati ljudsko adenoidno tkivo u laboratoriju (Rowe i sur. 1953).

Otkriće nove skupine virusa koji prvenstveno utječu na bolesti respiratornog sustava dovelo je do imenovanja porodice Adenoviridae s obzirom na tkivo iz kojega je virus prvi put izoliran (Enders i sur. 1956). Različiti ljudski adenovirusni serotipi, njih čak 51, grupirani su u skupine od A do F na temelju veličine i organizacije genoma, homologije DNA, nukleotidnog sastava i onkogenosti (Zhang 1999, Chaurasiya i Hitt 2016). Najčešće proučavana skupina u virologiji i molekularnoj

biologiji je skupina C koja se sastoji od adenovirusa tipa 1, 2, 5 i 6. U laboratoriju su najčešći adenovirus 2 (Ad2) i Ad5 koji se koriste kao vektori za isporuku gena (Zhang 1999).

Adenovirusna čestica je ikozaedarskog oblika veličine 70-90 nm koja sadrži linearni dvolančani genom DNA od približno 36 kilobaznih parova (kbp) (Chaurasiya i Hitt 2016). Struktura adenovirusne čestice prikazana je na Slici 3. Adenovirus čini vanjska kapsida i unutarnja jezgra (Ip i Qasim 2013). Razlikujemo tri glavna kapsidna proteina adenovirusa: vlakna, pentonske baze i hekzone.

Vrhovi ikozaedra sastoje se od pentonskih baza koje usidruju proteine vlakana koja su odgovorna za primarno vezanje virusa na staničnu površinu domaćina dok se heksoni nalaze na površini jednakostraničnih trokuta ikozaedra (Campos i Barry 2007, Chaurasiya i Hitt 2016). Adenovirusna vlakna se sastoje od tri domene: kratki rep, domena drška i globularna domena glave (Campos i Barry 2007). Tri monomera vlakna trimeriziraju kako bi nastala struktura slična anteni smještena na svakom vrhu ikozaedarske kapside. Repna domena trimera pričvršćuje vlakno u penton i određena je višestrukim N-terminalnim aminokiselinskim ponavljanjima, domena drška omogućuje interakciju sa stanicom domaćina, a domena glave omogućuje vezanje za CAR (engl. *coxsackie-adenovirus receptor*) na stanici domaćina (Khare i sur. 2011).



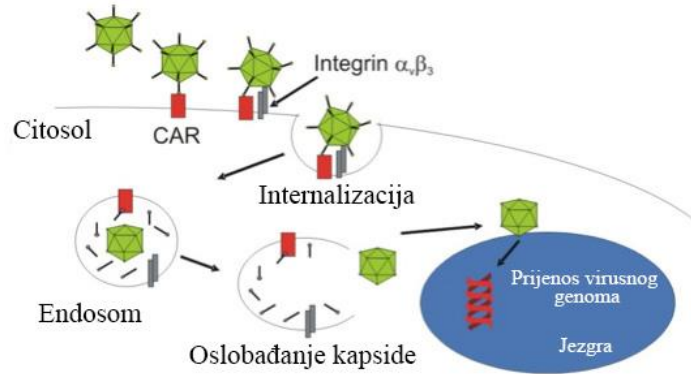
Slika 3: Struktura adenovirusa (preuzeto i prilagođeno prema <https://nptel.ac.in/courses/102103041/module2/lec13/1.html>).

1.5.2. Životni ciklus adenovirusa Ad5

Životni ciklus Ad5 započinje njegovim ulaskom u stanicu domaćina koji uključuje interakciju virusne čestice sa staničnim receptorom (Zhang 1999).

Istraživanja *in vitro* pokazala su da je početno vezanje Ad5 visokog afiniteta posredovano interakcijom distalne domene glave adenovirusnog vlakna za staničnu površinu domaćina, točnije s receptorom CAR koji pripada tipu 1 transmembranskog proteina superobitelji imunoglobulina (Howitt i sur. 2003). Receptor CAR je protein veličine 46 kDa koji predstavlja funkcionalni adenovirusni receptor. CAR sadrži transmembransku, citoplazmatsku i izvanstaničnu domenu. S obzirom da se vlakno Ad5 veže na molekulu koja predstavlja receptor za virus coxsackie tipa B, naziva se coxsackie/adenovirusnim receptorom (CAR) (Bergelson i sur., 1998).

Nakon vezanja na primarni receptor CAR, virus ulazi endocitozom u stanice internalizacijom u endosomalne vezikule (Slika 4). Aminokiselinski slijed Arg-Gly-Asp (RGD) (Bai i sur. 1993) na bazi pentonskog proteina omogućuje interakciju sa staničnim receptorima integrina $\alpha\beta 5$ i $\alpha\beta 3$ (Wickham i sur. 1993). Interakcija pentonskih baza s integrinima je također potrebna za aktivaciju cisteinskih proteaza koje sudjeluju u razgradnji virusne kapside (Nemerow 2000). Nakon internalizacije, kiselo okruženje endosoma dovodi do izlaska virusa u citoplazmu lizom endosomske membrane (Pastan i sur. 1986, Chaurasiya i Hitt 2016). Virusne čestice zatim se specifično vežu na mikrotubule i njima pomiču prema kompleksu nuklearnih pora. U različitim fazama pri prijenosu do nuklearne pore od virusa se odvajaju pojedini proteini, od kojih su neki i degradirani (Greber i sur. 1993). Virusni genom se u konačnici uvodi u jezgru kroz kompleks nuklearne pore i dolazi do ekspresije viralnih gena (Wagner i sur. 1992, Chaurasiya i Hitt 2016).



Slika 4: Endocitoza adenovirusne čestice (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.creative-diagnostics.com/tag-adenovirus-antigens-1.htm>).

1.5.1. Genom adenovirusa tipa 5 (Ad5)

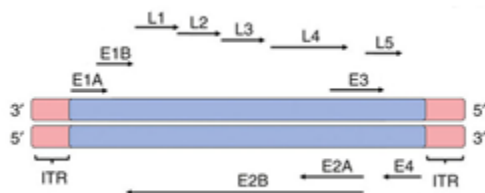
Genom Ad5 je dvolančana linearna molekula DNA dugačka 36 kb. Svaki kraj viralnog genoma ima ponavljajući DNA slijed od 100 do 150 bp poznat kao inverzna terminalna ponavljanja (ITR). Lijevi ITR kraj (194-385 bp) sadrži signal pakiranja ψ (*engl. encapsidation signal, ES*). ITR regije kao i signal za pakiranje sadrže cis-aktivirajuće elemente potrebne za replikaciju i pakiranje viralne DNA u kapsidu (Zhang 1999, Ostapchuk i Hearing 2003). Terminalni protein (TP) je kovalentno vezan na 5' kraj svakog virusnog DNA lanca (Rekosh i sur. 1977) i sintetiziran je kao prekursor (pTP) koji ima važnu ulogu u inicijaciji replikacije virusa (Kelly 1984). Razlikujemo rane (E) i kasne (L) regije genoma koji sadrže različite transkripcijske jedinice podijeljene prema početku virusne DNA replikacije (Zhang 1999).

1.5.3. Replikacija adenovirusa

Replikativni ciklus adenovirusa počinje od njihova ulaska u stanice i završava pri otpuštanju iz liziranih, zaraženih stanica. Svaki replikativni ciklus traje 32-36 sati i dijeli se na ranu fazu u kojoj dolazi do ekspresije ranih gena i kasnu fazu koju karakterizira virusna replikacija DNA, ekspresija kasnih gena i sastavljanja virusa traje ostatak vremena (Shaw i Ziff 1980, Zhang 1999). Transkripcijske jedinice adenovirusne čestice prikazane su na Slici 5. Proizvodi ranih gena, kao i replikacija virusne DNA su preduvjeti za ekspresiju kasnih gena (Thomas i Mathews 1980).

Ekspresija ranih gena započinje ulaskom virusne DNA u stanice i to redoslijedom E1A, E1B, E2, E3 i E4, a nakon koje slijedi ekspresija intermedijarnih gena te na kraju kasnih gena. Ekspresiju kasnih gena (L1-L5) koji kodiraju za većinu virusnih kapsidnih proteina omogućuje zajednički

glavni kasni promotor (engl. *Major late promoter*, MLP) (Shaw i Ziff 1980, Chaurasiya i Hitt 2016).



Slika 5: Prikaz transkripcijskih jedinica adenovirusa (preuzeto i prilagođeno prema Afkhamy i sur. 2016).

1.5.4. Adenovirusni vektori prve generacije

Adenovirusi mogu poslužiti kao dobri vektori zbog svojih svojstava, npr. oni prenose gene u širokom spektru tipova stanica, a da pritom prienos gena ne ovisi o aktivnoj podjeli stanica. Dodatno, mogu se dobiti visoki titri virusa i visoka razina ekspresije transgena (He i sur. 1998). Adenovirus ima mogućnost pakiranja do 105% genoma duljine divljeg tipa (wt) (Ghosh-Choudhury i sur. 1987) koje omogućava umetanje približno 1,8-2,0 kb strane DNA (Afkhami i sur. 2016). Uvođenjem delecija u ranu regiju E1 i/ili E3, mogu se konstruirati vektori s većim kapacitetom unosa strane DNA (Bett i sur. 1993). Adenovirusni vektori s deletiranom E1 regijom, bilo sa ili bez E3 delecije, nazivaju se vektori prve generacije (Danthinne i Imperiale 2000). Brisanje E1 regije omogućuje umetanje transgena veličine do 5,1 kb (Chaurasiya i Hitt 2016). E1 delecija čini viruse nesposobnima za replikaciju i proizvodnju infektivnih virusnih čestica u ciljnim stanicama (He i sur. 1998). Nadalje, brisanje E3 zajedno s E1 regijom može dodatno povećati sposobnost umetanja stranih gena do veličine 8,2 kb (Douglas 2007).

2. CILJ RADA

Istraživanja su pokazala da su određene mutacije povezane s karcinomom pluća i KOPB-om i da je za funkcionalne analize potrebno napraviti ekspresijske konstrukte koji će se koristiti u različitim modelima *in vitro*. Međutim, velik broj staničnih linija je izuzetno rezistentan na unos strane DNA. Stoga je jedan od načina zaobilaženja ovog problema korištenje adenoviralnih konstrukata.

Cilj ovog diplomskog rada bio je konstruirati replikacijski defektne adenovirusne vektore uvođenjem gena za $TLR5^{wt}$ i $TLR5^{N592S}$ u okosnicu adenovirusa tipa 5 (Ad5) koji bi zatim omogućio ciljani unos tog gena u modelni organizam, u ovom slučaju humane stanice pluća, A549, WI38, H1299.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Stanice

3.1.1.1. Bakterijske stanice

U svrhu amplifikacije sljedova DNA pShuttle-CMV-TLR5^{N592S} i pShuttle-CMV-TLR5^{wt} korištene su kompetentne stanice *Escherichia coli*, soj DH5- α .

U svrhu dobivanja dovoljne količine Ad5-TLR5^{wt} i Ad5-TLR5^{N592S} korištene su kompetentne stanice *Escherichia coli*, soj DH5- α .

U svrhu konstrukcije rekombinantnog Ad5-TLR5 virusa manipulacijom Ad5 genoma kao plazmida u bakteriji *Escherichia coli* homolognom rekombinacijom korišten je bakterijski soj BJ5183.

3.1.1.2. Humane stanice

Stanična linija HEK-293 (engl. *human embryonic kidney*) korištena je za umnažanje konstruiranih adenovirusnih vektora Ad5-TLR5^{wt} i Ad5-TLR5^{N592S}.

Kao modeli za istraživanja *in vitro* korištene su humane stanične linije koje endogeno eksprimiraju gen koji kodira za receptor *TLR5*. Humane stanične linije koje su korištene su *WI38* – humana stanična linija zdravih fibroblasta epitelnog podrijetla iz tkiva pluća, *A549* – humana stanična linija epitelnog porijekla iz karcinoma pluća, *H1299* – humana stanična linija raka pluća nemalih stanica, metastatskog porijekla.

3.1.2. Hranjivi mediji

LB (Luria-Bertani) medij sastava: 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 10 g/L triptona i 10 g/L NaCl koji se nakon pripreme sterilizira autoklaviranjem. Ohlađenom sterilnom mediju doda se antibiotik kanamicin tako da konačna koncentracija bude 25 μ g/mL. U svrhu pripreme krute hranjive podloge u tekući medij dodaje se agar konačne koncentracije 12,5 g/L. Medij je korišten za uzgoj bakterije *Escherichia coli*.

DMEM medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose*, Sigma) koristi se za uzgoj HEK-293 stanica. Sadrži glukozu koncentracije 4500 mg/L, L-glutamin, natrijev hidrogenkarbonat. Prije upotrebe, originalnom pakiranju medija doda se fetalni goveđi serum (FBS, Sigma) do konačne koncentracije od 10%.

3.1.3. Sastav i priprema otopina

Pufer TD pripremljen je miješanjem 8 g NaCl i 0,38 g KCl otopljenih u 150 mL H₂O. Takvoj otopini potom se doda 0,1 g Na₂HPO₄, 3 g Tris baze i nadopuni vodom do 500 mL. Vrijednost pH mora biti između 7,4 i 7,5 što se postiže dodatkom HCl 5M nakon čega se otopina nadopuni vodom do ukupnog volumena od 1 L. Nakon pripreme otopina se alikvotira i autoklavira u trajanju od 20 minuta.

Otopina cezijevo klorida gustoće 1,25 pripremljena je otapanjem 36,16 g cezijevo klorida u 100 mL pufera TD.

Otopina cezijevo klorida gustoće 1,34 pripremljena je otapanjem 51,20 g cezijevo klorida u 100 mL pufera TD.

Otopina cezijevo klorida gustoće 1,40 pripremljena je otapanjem 62,00 g cezijevo klorida u 100 mL pufera TD.

Otopina P1 za resuspenziju bakterija sadrži 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, nadopunjenih vodom do 500 mL, a vrijednost pH mora biti 8,0. Nakon pripreme otopina se autoklavira, a prije upotrebe u otopinu se dodaje RNAza A konačne koncentracije 100 µg/mL.

Otopina P2 za lizu sadrži 200 mM NaOH, 1% SDS koji su nadopunjeni vodom do 500 mL.

Otopina P3 za neutralizaciju sadrži 3 M KAc, vrijednost pH namješta se octenom kiselinom do konačnog iznosa 5.5 nakon čega se otopina nadopuni vodom do 500 mL.

Otopina 70%-tnog etanola priprema se dodavanjem 30 mL mqH₂O u 70 mL 100%-tnog etanola.

Gel za razdvajanje 10%-tni pripremljen je miješanjem 1,5 mL mqH₂O, 1,85 mL TRIS 1M čija vrijednost pH iznosi 8,8, 50 µL 10%-tnog SDS-a, 1,65 mL 30% akrilamida, 25 µL APS i 2,5 µL TEMED-a.

Gel za sabijanje 5%-tni pripremljen je miješanjem 1,4 mL mqH₂O, 0,25 mL TRIS 1M čija vrijednost pH iznosi 6,8, 20 µL 10%-tnog SDS-a, 0,35 mL 30% akrilamida, 10 µL APS i 2 µL TEMED-a.

Pufer Hot lysis Laemmli 6x pripremljen je otapanjem 1,2 g SDS-a u 2 mL biH₂O nakon čega se u tu otopinu dodaje 2,5 mL Tris-HCl-a čija vrijednost pH iznosi 6,8, 20 mg bromfenol plavog. Nakon što se tako pripremljena smjesa otopi, u nju se dodaje 3 mL glicerola i 1,2 mL merkaptetanola.

3.1.4. Komercijalni kompleti

QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen) korišten je u svrhu pročišćavanja inserta TLR5 iz 0,6%-tnog agaroznog gela.

Izolacija plazmidne DNA metodom midi-prep provedena je pomoću kita *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega)*.

Izolacija plazmidne DNA metodom „ručni mini-prep“ provedena je pomoću *QIAprep SpinMiniprep (Qiagen)* kompleta za izolaciju.

Izolacija plazmidne DNA metodom mini-prep provedena je pomoću kompleta za izolaciju *PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)*.

Detekcija proteinskih vrpca metodom Western provedena je pomoću kompleta za detekciju *Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad)*.

3.1.5. Enzimi i antitijela

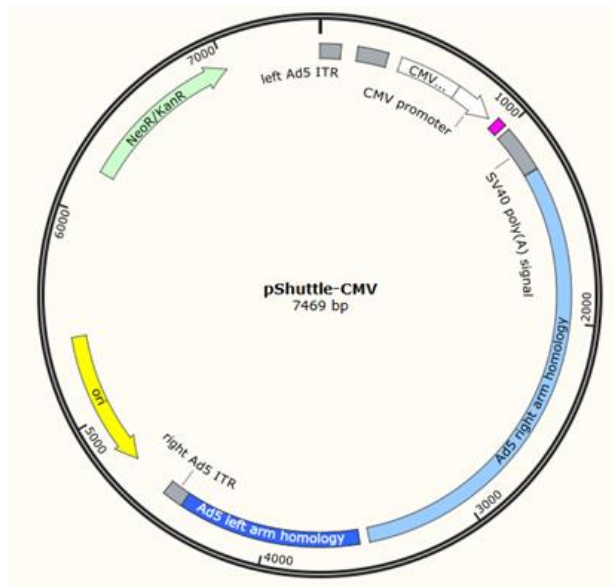
EcoRV (NEB), rSAP, T4 DNA-ligaza (NEB), Taq DNA polimeraza (NEB), *PmeI* (NEB), *BamHI* (NEB), *PacI* (NEB), monoklonskog anti-HA antitijela (Santa Cruz Biotechnology, Inc), Anti-miš imunoglobulin G antitijelo s konjugiranom peroksidazom (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

3.1.6. Osnovne kemikalije

NEBuffer 3.1 (NEB), CutSmart pufer (NEB), agaroz (Roth), pufer TAE, EtBr (Sigma), Gel Loading Dye Purple 6x (NEB), izopropanol, 5M NaCl, etanol, fenol : kloroform : izoamil alkohol u omjeru 25 : 24 : 1, Pufer za T4 DNA-ligazu, 70%-tni etanol, pufer-Mg²⁺ (NEB), smjesa dNTP-ova (NEB), Lipofectamine 2000, OptiMEM®, DMEM HG (Sigma), DPBS (Lonza), tripsin, PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), 100 bp DNA Ladder, Quick-Load 2-Log DNA Ladder (NEB).

3.1.5. Plazmidi

Plazmid Shuttle-CMV sadrži 7469 parova baza i korišten je za konstrukciju rekombinantnog plazmida s ugrađenim divljim i mutiranim, N592S tipom gena koji kodira za receptor TLR5. Ovaj plazmid sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin (Kan), izvorište replikacije (ORI), lijevu i desnu obrnutu ponavljajuću sekvencu ITR, lijevu i desnu ruku homologije koje sadrže sekvence homologne pAdEasy (Slika 6). Između promotora citomegalovirusa čovjeka (CMV) i poliadenilacijskog signala virusa SV40 nalazi se MCS (engl. *multiple cloning site*).

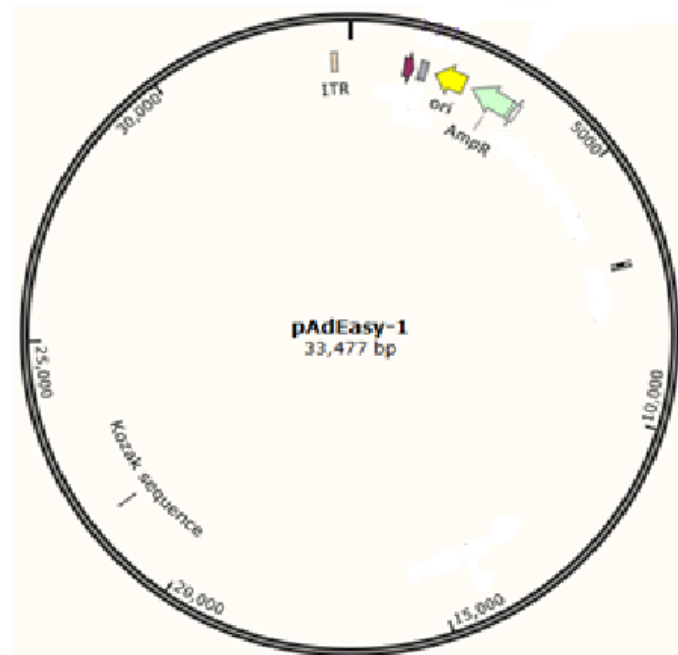


Slika 6: Mapa plazmida pShuttle-CMV. Mapa je konstruirana korištenjem programskog alata *SnapGene*TM 1.1.3. Na mapi su prikazani izvorište replikacije (ori), promotor citomegalovirusa čovjeka (CMV), gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin i neomicin (NeoR/KanR), poliadenilacijski signal virusa SV40, lijeva i desna obrnuto ponavljajuća sekvencu ITR, lijeva i desna ruka homologije, višestruko mjesto za kloniranje (MCS).

Plazmid AdEasy-1 sadrži 33 477 parova baza i korišten je u svrhu konstrukcije rekombinantnog Ad5-TLR5 virusa manipulacijom Ad5 genoma kao plazmida u bakteriji *Escherichia coli* pri čemu je korištena homologna rekombinacija između uzoraka pShuttle-CMV-TLR5 i vektora pAdEasy.

Plazmid sadrži gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (Amp) koji se gubi nakon homologne rekombinacije sa slijedom DNA pShuttle-CMV-TLR5. Izvorište replikacije pBR322, Ad5 lijevu i desnu ruku homologije koje sadrže sekvence homologne vektoru pShuttle-CMV.

Plazmid nosi i deleciju za gene E1 i E3 što omogućava umetanje inserta, odnosno onemogućava replikaciju virusa. Mapa plazmida AdEasy-1 prikazana je na Slici 7.



Slika 7: Mapa plazmida AdEasy-1. Mapa je konstruirana korištenjem programskog alata *SnapGeneTM 1.1.3*. Na mapi su prikazani izvorište replikacije (ori), gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (AmpR), kozak sekvenca, obrnuto ponavljajuća sekvenca ITR.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vektora pShuttle-CMV za ligaciju

3.2.1.1. Određivanje masene koncentracije vektora pShuttle-CMV

U svrhu određivanja masene koncentracije vektora pShuttle-CMV, korišten je spektrofotometar s kojega je očitana masena koncentracija vektora pShuttle-CMV. Masena koncentracija vektora pShuttle-CMV očitana je mjerenjem apsorbancije pri 260 nm, kao i omjer apsorbancije (engl. *optical density*, OD) 260/280 nm i 230/280 nm. Potom je u svrhu razgradnje vektora pShuttle-CMV restriksijskom endonukleazom *EcoRV* izračunata srednja masena koncentracija vektora pShuttle-CMV. Srednja masena koncentracija izračunata je preko formule:

$$\bar{\gamma} = \frac{\gamma_1 + \gamma_2 + \dots + \gamma_n}{n}$$

Gdje je: $\bar{\gamma}$ – srednja masena koncentracija (ng/ μ L), γ – masena koncentracija pri 260 nm, n – ukupni broj očitavanja masene koncentracije uzorka pri 260 nm.

3.2.1.2. Razgradnja vektora pShuttle-CMV restriksijskom endonukleazom *EcoRV*

U svrhu hidrolize fosfodieterske veze vektor pShuttle-CMV podvrgnut je restriksijskoj razgradnji pomoću restriksijske endonukleaze *EcoRV*. Cijepanje vektora pShuttle-CMV s restriksijskim enzimom *EcoRV* provedeno je prema uputama proizvođača restriksijskog enzima.

3.2.1.3. Precipitacija, defosforilacija i pročišćavanje vektora pShuttle-CMV

U svrhu talođenja vektoru pShuttle-CMV dodala se otopina 5 M NaCl u ukupnom volumenu od 7,5 μ L, 67,5 μ L mqH₂O i 250 μ L EtOH ohlađenog na -20°C. Smjesa se potom centrifugirala u vremenskom trajanju od 15 minuta na 4°C i 25 000 x g. Potom je supernatant uklonjen, a talog je ostavljen na zraku u trajanju od 20 minuta u svrhu njegova sušenja.

U svrhu sprječavanja cirkularizacije vektora pShuttle-CMV tijekom postupka ligacije korištena je metoda defosforilacije vektora pShuttle-CMV.

Postupak defosforilacije proveden je prema uputama proizvođača alkalne fosfataze rSAP (engl. *Shrimp Alkaline Phosphatase*).

U svrhu pročišćavanja vektora pShuttle-CMV nakon defosforilacije, u smjesu defosforiliranog vektora pShuttle-CMV ukupnog volumena 50 μ L dodalo se 50 μ L mqH₂O i 100 μ L otopine fenol : kloroform : izoamil alkohol u omjeru 25 : 24 : 1. Pripremljena smjesa se potom centrifugirala na 15 000 x g u trajanju od 3 minute nakon čega se pokupio supernatant. U 70 μ L supernatanta dodao

se 5 M NaCl u volumenu od 6 μ L, 24 μ L mqH₂O i 200 μ L EtOH sa -20°C. Pripremljena smjesa s ukupnim volumenom od 100 μ L se centrifugirala na 25 000 x g na temperaturi od 4°C u trajanju od 15 minuta. Talog pročišćenog vektora pShuttle-CMV potom se otopio u 20 μ L mqH₂O i kao takav spremio na -20°C.

3.2.2. Izolacija inserata *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} za ligaciju

3.2.2.1. Izrezivanje inserata iz ekspresijskih klonova restrikcijom endonukleazom *PmeI*

U svrhu pripreme restrikcijske smjese za izrezivanje inserata koji kodiraju gene za *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} iz ekspresijskih klonova pcDNA3.1 h*TLR5*^{wt} i pcDNA3.1 h*TLR5*^{N592S} na spektrofotometru su pri 260 nm očitane masene koncentracije i OD 260/280 nm i 230/280 nm ekspresijskih klonova pcDNA3.1 h*TLR5*^{wt} i pcDNA3.1 h*TLR5*^{N592S}. Potom je izračunata srednja masena koncentracija ekspresijskih klonova pcDNA3.1 h*TLR5*^{wt} i pcDNA3.1 h*TLR5*^{N592S}.

Izrezivanje inserata iz ekspresijskih klonova s restrikcijom enzimom *PmeI* provedeno je prema uputama proizvođača *PmeI* restrikcijom enzima. Pripravljena je restrikcijom smjesa u ukupnom volumenu od 50 μ L dodatkom 1 μ g ekspresijskog klona pcDNA3.1 h*TLR5*^{wt} odnosno ekspresijskog klona pcDNA3.1 h*TLR5*^{N592S}.

3.2.2.2. Agarozna gel-elektroforeza

U svrhu razdvajanja, pročišćavanja i same identifikacije nukleinskih kiselina na temelju njihove molekulske mase i veličine koristi se metoda agarozne gel-elektroforeze. Pod utjecajem električnog polja dolazi do gibanja nukleinskih kiselina kroz agarozni gel prema njegovom pozitivnom polu. Molekule se kroz gel gibaju ovisno o veličini što znači da će manje čestice putovati brže od onih većih. Za detekciju nukleinskih kiselina koristi se etidij bromid koji se ugrađuje između baza DNA te na taj način nakon postavljanja uzorka DNA pod UV svjetlo transiluminatora omogućuje detekciju fluorescencije.

U svrhu potvrde prisutnosti inserata koji kodiraju gen za *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} pripremljene restrikcijske smjese iz prethodnog koraka nanose se na 1%-tni agarozni gel. Ovakav gel pripremljen je otapanjem 1,0 g agaroze u 100 mL pufera TAE (sastava: 40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA) u tikvici. Otapanje se vrši zagrijavanjem otopine do vrenja u mikrovalnoj pećnici, nakon čega se otopina hladi na sobnoj temperaturi te joj se potom dodaje 0,5 μ L EtBr. Ohlađena otopina agaroze ulije se u kadicu za elektroforezu u koju su prethodno dodani češljici za tvorbu jažica. Nakon skrutnjavanja, gel se postavi u uređaj za elektroforezu koji je

ispunjen puferom TAE. Kako bi se omogućilo vizualno praćenje elektroforeze uzorci kao i marker molekularnih masa (*Quick-Load 2-Log DNA Ladder(NEB)*) pomiješaju se s migracijskim bojilom (Gel Loading Dye, Purple 6x (NEB)) u omjeru 6:1.

Nakon potvrđene prisutnosti inserata koji kodiraju gen za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}* provedena je gel-elektroforeza.

3.2.2.3. Pročišćavanje *TLR5* inserata

U svrhu izolacije inserata koji kodiraju gen za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}* nakon provedene gel-elektroforeze skalpelom se iz 0,6%-tnog agaroznog gela izrezala najniža vrpca koja je odgovarala insertima koji kodiraju gen za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}*. Koristio se *QIAquick Gel extraction Kit* po uputama proizvođača. Iz razlike mase prazne epruvete i epruvete s insertom izračunala se masa samog inserta. Potom su se u svaku epruvetu s insertom dodala 3 volumena pufera QG. Takve suspenzije zatim su se inkubirale na 50°C 10 minuta uz povremeno miješanje na vorteksu u svrhu potpunog otapanja agaroznog gela. U sljedećem koraku dodao se jedan volumen izopropanola u epruvete s insertima koji kodiraju gen za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}*. Uzorci su se potom prebacili u kolone QIAquick i centrifugirali 60 sekundi, na 17 900 x g. Potom se u svaku kolonu u svrhu ispiranja dodalo po 750 µL pufera PE te su kolonice inkubirane 3 minute na sobnoj temperaturi. Kolone su se zatim centrifugirale u trajanju od 1 minute pri 17 900 x g. Potom su kolone premještene u čiste epruvete i na sredinu membrane svake kolonice dodalo 40 µL elucijskog pufera EB te su kolonice potom inkubirane 4 minute. U svrhu uklanjanja supernatanta epruvete su centrifugirane 60 sekundi, pri 17 900 x g. Kolonice su potom uklonjene, a talozi s pročišćenim insertima koji kodiraju gene za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}* ostali su u epruvetama.

3.2.3. Ligacija inserata *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}* u vektor pShuttle-CMV

U svrhu podešavanja omjera inserata *TLR5^{wt}*, *TLR5^{N592S}* i vektora pShuttle-CMV u odnos 5:1 na spektrofotometru su određene masene koncentracije gena koji kodiraju za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}*.

Masa potrebnog inserta se računa preko formule:

$$m(\text{insert, ng}) = \frac{m(\text{vektor, ng}) \cdot M(\text{insert, bp})}{M(\text{vektor, bp})} \cdot X,$$

U svrhu pripreme ligacijske smjese korišten je enzim T4 DNA-ligaza prema uputama proizvođača enzima. Ukupni volumen ligacijskih smjesa bio je 50 µL, a njihov sastav prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1: Sastav ligacijskih smjesa za ligaciju inserata koji kodiraju gen za *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} u vektor pShuttle-CMV (prva i druga ligacijska smjesa). Treća ligacijska smjesa predstavlja negativnu kontrolu i ne sadrži insert.

Otopina	<i>TLR5</i> ^{wt} Volumen (μL)	<i>TLR5</i> ^{N592S} Volumen (μL)	Negativna kontrola Volumen (μL)
Pufer za T4 DNA-ligazu 10 x	5	5	5
T4 DNA ligaza	1	1	1
insert	32,5	27,8	/
pShuttle-CMV	5	5	5
mqH ₂ O	6,5	11,2	39

Pripremljene ligacijske smjese inkubirale su se preko noći na 16°C.

3.2.4. Transformacija kompetentnih bakterija *Escherichia coli* DH5-α temperaturnim šokom

Kemijska transformacija, kao i elektroporacija, metode su kojima se vrši transformacija rekombinantne molekule DNA u domaćina. Kemijska transformacija uključuje pripremu kompetentnih bakterijskih stanica tretmanom s ledeno hladnim CaCl₂ prilikom kojega se stanična membrana bakterija opusti i stvaraju se pore na njoj. Stvaranje pora omogućuje slobodan ulaz rekombinantne DNA molekule u stanicu domaćina nakon toplinskog šoka pri 42°C.

Koraci koji uključuju transformaciju bakterijskih stanica DH5-α provodili su se na ledu, pored upaljenog plamenika kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije.

U svrhu amplifikacije plazmidnih konstrukata korištene su kompetentne bakterijske stanice *Escherichia coli*, soj DH5-α. Tri epruvete s po 50 μL kompetentnih bakterijskih stanica DH5-α s -80°C, odmrzavale su se na ledu. U prvu epruvetu dodalo se 3 μL pripremljene ligacijske smjese s insertom koji kodira gen za *TLR5*^{wt}, u sljedeću epruvetu dodalo se 3 μL ligacijske smjese s insertom koji kodira gen za *TLR5*^{N592S} i u treću epruvetu dodalo se 3 μL ligacijske smjese bez inserta. Transformirane stanice zatim su se inkubirale na ledu 30 minuta nakon čega je slijedio „toplinski šok“ inkubacijom na 42°C u trajanju od 45 sekundi. Nakon toga stanice su se vratile na led u trajanju od 2 minute. Takvoj suspenziji stanica zatim se dodalo 950 μL LB-medija sa sobne temperature. Sljedeći korak uključio je oporavak stanica u trajanju od 60 minuta na 37°C, u rotacijskoj tresilici na 250 rpm-a. Razmaz bakterijskih suspenzija koji je slijedio nakon oporavka

stanica vršio se na krutim LB-podlogama s kanamicinom nakon čega su takve podloge inkubirane preko noći na 37°C .

Nakon 20 sati, s krutih hranjivih podloga odabrano je po 20 različitih kolonija iz dviju ploča tretiranih s ligacijskom smjesom sa željenim insertom i iste su prenesene u 5 mL tekuće LB hranjive podloge koja sadrži 5 µL kanamicina. Prenošenje se postiglo doticanjem odgovarajuće bakterijske kolonije sterilnim nastavkom koji se potom inkubira preko noći u tresilici uz stalnu vrtnju od 250 rpm-a i pri 5%-tnim CO₂.

3.2.5. Izolacija plazmidne DNA

U svrhu izolacije plazmidne DNA iz bakterijskih stanica *Escherichia coli* soj DH5-a provedena je metoda „mini-prep“ komercijalno dostupnim kompletom za izolaciju *QIAprep SpinMiniprep (Qiagen)*. Volumen od 1 mL svih 40 prekononoćnih kultura pripremljenih u koraku 3.2.4. prebacio se u 1,5 mL epruvete i centrifugiran na 8 000 rpm-a u trajanju od 3 minute. Sljedeći korak uključio je resuspendiranje taloga u 200 µL P1 otopine ohlađene na temperaturi od 4°C. Potom se takvim suspenzijama dodaje 200 µL otopine P2, a epruvete se preokrenu 6 puta. Suspenzije su potom inkubirane u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi te je u njih dodano 200 µL otopine P3 ohlađene na 4°C. Zatim se u svrhu miješanja sadržaja epruveta one okreću pet puta. Epruvete su potom centrifugirane u trajanju od 10 minuta na 18 000 rpm-a i 4°C. Supernatanti su prebačeni u nove 1,5 mL epruvete u koje je potom dodano 450 µL izopropanola te su zatim centrifugirane na 4°C 20 minuta i 18 000 rpm-a. Talozima na dnu epruveta potom je dodano 500 µL 70%-tnog etanola nakon čega su smjese centrifugirane 10 minuta na 4°C i 18 000 rpm-a. Nakon centrifugiranja uklonjen je etanol iz epruveta. U svrhu sušenja, talozi DNA s dna epruveta ostavljeni su na zraku u trajanju od 30 minuta nakon čega su otopljeni u 40 µL mqH₂O. Masene koncentracije izolirane DNA očitale su se na spektrofotometru pri 260 nm.

3.2.6. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) je metoda koja omogućuje umnažanje specifičnih fragmentata DNA. Svaka PCR reakcija zahtijeva prisutnost DNA koju se želi umnožiti, početnica, nukleotida i DNA polimeraze. DNA polimeraza je ključni enzim koji povezuje pojedinačne nukleotide kako bi se formirao PCR produkt. Nakon pripreme, reakcijska otopina stavlja se u uređaj koji podizanjem i spuštanjem temperature omogućuje ponavljanje reakcija umnažanja DNA koje se odvijaju u tri glavna koraka. Reakcijska otopina se

prvo zagrijava iznad točke taljenja dvaju komplementarnih lanaca DNA što omogućava njihovo razdvajanje, a proces je nazvan denaturacijom. Temperatura se zatim spušta kako bi se specifičnim početnicima omogućilo komplementarno vezanje na ciljne DNA segmente, proces poznat kao hibridizacija. Ponovno se podiže temperatura kako bi DNA polimeraza mogla dodavati nukleotide na rastući DNA lanac. Svakim ponavljanjem ova tri koraka, broj kopiranih molekula DNA udvostručuje se (Garibyan i Avashia 2013).

U svrhu potvrde uspješne ligacija inserta koji kodira gen za $TLR5^{wt}$, odnosno $TLR5^{N592S}$ u vektor pShuttle-CMV korištena je metoda PCR. Prvo su pripremljene matične otopine za svaki od 40 uzoraka DNA prethodno izoliranih iz stanica DH5- α , u ukupnom volumenu od 50 μ L i s odgovarajućom masenom koncentracijom od 10 ng/ μ L.

Potom su pripremljene reakcijske smjese PCR u epruvetama PCR za svaki od 40 uzoraka potencijalnih pozitivnih liganada, ukupnog volumena od 25 μ L.

Kao pozitivna kontrola korišten je ekspresijski klon pcDNA3.1 hTLR5^{wt}. Korištena je i negativna kontrola koja je umjesto uzorka DNA sadržavala mqH₂O dok je sastav ostatka PCR smjese bio isti kao i za ostale uzorke DNA. Uvjeti pri kojima se PCR provodio navedeni su u Tablici 2.

Očekivani produkt PCR reakcije iznosio bi 143 parova baza, a amplificirana regija je od 1249 bp do 1391 bp za konstrukte pShuttle-CMV-TLR5^{N592S}, tj. amplificirana regija konstrukta pShuttle-CMV-TLR5^{wt} bila bi od 1231 bp do 1373 bp.

Nukleotidni sljedovi korištenih početnica:

- Uzvodna početnica: 5' – GCTCCTGCTGAGCTTCAACT - 3'
- Nizvodna početnica: 5' – TAAGGTTGGGCAGGTTTCTG - 3'

Tablica 2: Temperaturni program korišten za PCR reakciju

KORAK	TEMPERATURA/°C	TRAJANJE
Početna denaturacija	94	2 minute
Denaturacija	94	15 sekundi
Komplementarno sparivanje početnica	53	30 sekundi

Sinteza DNA	72	45 sekundi
Završna sinteza	72	7 minuta

Nakon provedene PCR reakcije u svrhu potvrde uspješnosti umnažanja fragmenata DNA lančanom reakcijom polimeraze provedena je elektroforeza na 1,5%-tnom agaroznom gelu u vremenu trajanja od 1 sat pri 80 V.

3.2.7. Razgradnja uzoraka restrikcijskim endonukleazama *PmeI* i *BamHI*

U svrhu dodatne potvrde uspješne ligacije konstrukata pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-1}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-10}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-11}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-4}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} pripremljene su restrikcijske smjese prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima *PmeI* i *BamHI*.

Nakon reakcije razgradnje enzimima *PmeI* i *BamHI* provedena je elektroforeza pri 90 V u trajanju od 1 sat na 1,5%-tnom agaroznom gelu.

3.2.8. Izolacija plazmidne DNA metodom mini-prep

U svrhu izolacije plazmidne DNA iz uzoraka pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} metodom mini-prep korišten je komercijalno dostupan komplet za izolaciju *PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)* prema uputama proizvođača.

3.2.9. Izolacija plazmidne DNA metodom midi-prep

U svrhu izolacije plazmidne DNA uzoraka pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV TLR5^{N592S-4} iz prekonocnih kultura metodom midi-prep korišten je komercijalno dostupan komplet za izolaciju *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega)* prema uputama proizvođača.

3.2.10. Potvrda ispravne orijentacije inserta koji kodira gen za *TLR5*

U svrhu potvrde prisutnosti i pravilne orijentacije inserta koji kodira gen za *TLR5* provedena je metoda lančane reakcije polimerazom kojom su umnoženi sljedovi DNA pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-3}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-10} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4}.

Pripravljena je smjesa za PCR reakciju uzoraka prethodno pripremljenih otopina midi-prep iz koraka 3.2.11. za sljedove DNA pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-3}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-10} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} kao i mini-prep otopina uzoraka pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} pripremljenih u koraku 3.2.10, pozitivnu i negativnu kontrolu. Ukupni volumen pripremljenih smjesa iznosio je 25 µL. Kao pozitivna kontrola koristio

se uzorak pcDNA3.1 hTLR5^{wt}. Sastav smjese negativne kontrole isti je kao sastav ostalih uzoraka, ali je umjesto DNA uzorka dodan 1 µL mqH₂O.

Sastav i uvjeti reakcije nalaze se u Tablicama 3 i 4.

Očekivani produkt PCR reakcije iznosio bi 316 bp, a amplificirana regija je od 1003 bp do 1318 bp za konstrukte DNA pShuttle-CMV-TLR5^{N592S}. Dok bi očekivani produkt za konstrukte pShuttle-CMV-TLR5^{wt} iznosio 298 bp, a amplificirana regija je od 1003 bp do 1300 bp.

Tablica 3: Sastav smjese reakcije PCR za uzorke korištene u svrhu potvrde ispravne orijentacije inserta koji kodira gen za *TLR5*.

reagensi	Volumen (µL)
mqH ₂ O	18
Pufer 10x Standard Taq Reaction	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Početnica fw (10 µM)	1
Početnica rev (10 µM)	1
DNA (10 ng/µL)	1
Taq DNA polimeraza	1

*Taq DNA polimeraza dodaje se posljednja, a priprema reakcijske smjese vrši se na ledu

Tablica 4: Temperaturni program korišten za PCR reakciju

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura (°C)	Vrijeme
Početna denaturacija	94	2 minute
Denaturacija	94	15 sekundi
Komplementarno sparivanje početnica	60	30 sekundi
Sinteza DNA	72	45 sekundi
Završna sinteza	72	7 minuta

Nukleotidni sljedovi korištenih početnica:

- Uzvodna početnica: 5' - GAGCTCGGATCCACTAGTCC - 3'
- Nizvodna početnica: 5' - CTGCAGCTGTTCCAGAAAGG - 3'

Nakon provedene reakcije PCR u svrhu potvrde uspješnosti umnažanja fragmenata DNA lančanom reakcijom polimeraze provedena je elektroforeza na 1%-tnom agaroznom gelu u vremenu trajanja od 1 sat pri 80 V.

3.2.11. Razgradnja konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 restrikcijskom endonukleazom *PmeI*

U svrhu transformacije bakterijskih stanica *Escherichia coli* soj BJ5183 provedena je linearizacija konstrukta pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} restrikcijskom razgradnjom pomoću restrikcijske endonukleaze *PmeI*. Ukupni volumen restrikcijske smjese iznosio je 50 µL, a iste su pripremljene prema uputama proizvođača restrikcijske endonukleaze *PmeI*.

3.2.12. Transformacija kompetentnih bakterija *Escherichia coli* BJ5183-AD-1 elektroporacijom

Elektroporacija kao i kemijska transformacija, metoda je kojom se unosi rekombinantna DNA u stanicu domaćina. Propuštanje električnog polja omogućuje permeabilnost stanične membrane i stvaranje kanala u membrani kroz koje rekombinantna DNA molekula ulazi u stanicu.

U svrhu konstrukcije rekombinantnog Ad5-TLR5 virusa manipulacijom Ad-5 genoma kao plazmida u bakterijama *Escherichia coli* homolognom rekombinacijom, koristio se bakterijski soj BJ5183. Bakterijske stanice *Escherichia coli* soj BJ5183, recBC sbcBC s ugrađenom adenovirusnom okosnicom pAdEasy-1 sadrži sljedove komplementarne slijedu DNA pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} odnosno pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} biti će transformirane postupkom elektroporacije. Kao rezultat homologne rekombinacije u bakteriji *Escherichia coli* između mjesta homologije dvaju plazmida nastaje plazmid s ugrađenim insertom koji kodira gen za *TLR5*^{wt}, odnosno *TLR5*^{N592S}.

Epruveta s BJ5183-AD-1 elektrokompetentnim stanicama sa -80°C, odmrznuta je na ledu nakon čega se 40 µL elektrokompetentnih stanica stavilo u kivetu za elektroporaciju prethodno ohlađenu na ledu. U dvije različite kivete potom je dodan 1 µL prethodno s restrikcijskim enzimom *PmeI* lineariziranog konstrukta pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6}, odnosno pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4}.

Kiveta se potom umetnula u elektroporator (*Gene Pulser Xcell, Bio-Rad*) i kroz nju se proveo visokovoltazni puls od 2,5 kV, otpor od 200 Ω i kapacitivnost od 25 µF u trajanju od 5 ms. Nakon provedenog pulsa u suspenziju stanica dodan je 1 mL tekućeg LB medija i bakterije resuspendirane. koji je potom resuspendiran. Nakon resuspenzije stanice su prebačene u sterilne epruvete od 15 mL i inkubirane u vremenu trajanja od 60 minuta u tresilici koja rotira brzinom od 250 rpm-a pri 37°C.

U svrhu selekcije pozitivnih transformanata, bakterije su nasadene na krutu LB podlogu s kanamicinom te su potom inkubirane preko noći na 37°C .

Nakon 20 sati po deset transformiranih kolonija iz svake krute LB podloge preneseno je u 5 mL tekuće hranjive podloge LB koja sadrži 5 µL kanamicina. Prenošnje se postiglo doticanjem kolonije sterilnim tipsem koje su kao takve inkubirane preko noći na 37°C, u rotacijskoj tresilici pri 250 rpm-a.

Potom je korištena metoda „mini-prep“ u svrhu izolacije plazmidne DNA iz 1 mL prekonoćnih kultura za 20 različitih kolonija. Prvih 10 prekonoćnih kultura iz kojih se vršila izolacija odgovaralo je transformantima Ad5-TLR5^{wt-6}, a drugih 10 kolonija odgovaralo je transformantima Ad5-TLR5^{N592S-4}.

3.2.13. Transformacija kompetentnih bakterija *Escherichia coli* DH5- α temperaturnim šokom

U svrhu amplifikacije dovoljne količine plazmida iz bakterije *Escherichia coli* dobivene homolognom rekombinacijom provedena je metoda kemijske transformacije bakterijskih stanica *Escherichia coli* soj DH5- α s prethodno izoliranim konstruktima Ad5-TLR5.

Razmaz bakterijskih suspenzija izvršen je na krutim LB podlogama s kanamicinom za selekciju transformiranih kolonija. Podloge su potom inkubirane na 37°C i pri 5%-tnim CO₂ preko noći.

Nakon 20 sati po dvije transformirane kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{wt3}, Ad5-TLR5^{wt8}, Ad5-TLR5^{N592S-3} i Ad5-TLR5^{N592S-4} prenesene su u 5 mL tekuće hranjive podloge LB s 5 µL kanamicina, doticanjem sterilnim tipsem. Takve suspenzije potom su inkubirane preko noći na 37°C uz stalnu trešnju pri 250 rpm-a. Nakon inkubacije, u svrhu izolacije plazmidne DNA korištena je metoda mini-prep. Na spektrofotometru su zatim pri 260 nm očitane masene koncentracije prethodno izolirane DNA za svih osam uzoraka u svrhu pripreme reakcije restrikcije s restrikcijskim enzimom *EcoRV*.

3.2.14. Razgradnja konstrukata Ad5-TLR5 restrikcijskom endonukleazom *EcoRV*

U svrhu potvrde homologne rekombinacije provedena je linearizacija konstrukta Ad5-TLR5^{wt-3} i Ad5-TLR5^{N592S-3} restrikcijskom razgradnjom pomoću restrikcijske endonukleaze *EcoRV*. Ukupni volumen restrikcijskih smjesa iznosio je 15 µL, a iste su pripremljene prema uputama proizvođača restrikcijske endonukleaze *EcoRV*.

Nakon inaktivacije restrikcijske endonukleaze *EcoRV* provedena je elektroforeza na agaroznom gelu u svrhu potvrde uspješnosti hidrolize fosfodiesterске veze okosnice DNA, za restrikcijske smjese.

3.2.15. Razgradnja uzoraka restrikcijskom endonukleazom *PacI*

U svrhu konačne potvrde uspješne homologne rekombinacije između bakterijskih stanica BJ5183-AD-1 i konstrukta pShuttle-CMV-TLR5^{wt-3} odnosno pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-3} pripremljene su restrikcijske reakcije s restrikcijskom endonukleazom *PacI*. Ukupni volumen restrikcijskih smjesa iznosio je 50 μ L, a iste su pripremljene prema uputama proizvođača restrikcijske endonukleaze *PacI*. Nakon razgradnje restrikcijskim enzimom *PacI* provedena je elektroforeza pri 90 V u trajanju od 1 sat na 1%-tnom agaroznom gelu.

3.2.16. Transfekcija HEK-293 stanica s adenovirusnim konstruktom

U svrhu umnažanja adenovirusnog konstrukta korištena je stanična linija HEK-293 (engl. *human embryonic kidney*). HEK-293 stanična linija je imortalizirana ugradnjom adenovirusnih ranih gena E1A u stanični genom. Komplementacijom u HEK-293 staničnoj liniji stvaraju se virusne čestice iz razloga što su rekombinantni vektori deficitarni u regiji E1A odgovornoj za replikaciju virusnog genoma.

HEK-293 stanična linija uzgajana je u plastične pločice sa 6 bunarića do postizanja 80% konfluentnosti površine na kojoj rastu. Plazmid s adenovirusnim genomom ugrađenim u plazmidnu osnovu prije transfekcije lineariziran je restrikcijskim enzimom *PacI*. Transfekcija HEK-293 stanica provedena je pomoću reagensa *Lipofectamine2000*. Pripremljena je otopina koja je sadržavala 230 μ L medija OptiMEM® u koju je dodano 4 μ g plazmidne DNA. Druga otopina pripremljena je miješanjem 240 μ L medija OptiMEM® i 10 μ L reagensa *Lipofectamine2000*. Nakon pripreme, sadržaj dvije otopine je pomiješan i inkubiran 20 minuta. Stanice HEK-293 isprane su hranjivom podlogom DMEM HG (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose*). Smjesi otopina dodan je DMEM te je dobivena smjesa prebačena na stanice u plastične pločice sa 6 bunarića. Nakon inkubacije u trajanju od 4 sata pri 37°C, zamijenjena je hranjiva podloga nad stanicama dodatkom po 2 mL svježeg DMEM u svaki bunarić. Ovako transfecirane stanice inkubirane su 10 dana pri 37°C i 5% CO₂.

Nakon deset dana inkubacije transfeciranih stanica, sadržaj plastičnih posuda sa 6 bunarića skupljen je, zamrznut pri temperaturi od -20°C i odmrznut pri 37 °C kroz 3 ciklusa, kako bi se

oslobodile virusne čestice iz stanica. Dobiveni lizat stanica centrifugiran je 5 minuta pri 3000 x g i odvojen je supernatant od ostataka stanica u talogu te spremljen na -20°C.

Stanice HEK-293 u 49 pasažu presađene su kada su dosegle 90% konfluentnosti tako što im je uklonjena tekuća podloga te su isprane s 4 mL fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffer saline*, PBS). Pufer je potom uklonjen, a stanice tretirane s 1 mL sterilnog tripsina. Tripsin predstavlja proteolitički enzim izoliran iz gušterače goveda koji iza karboksilne skupine arginina ili lizina omogućuje specifično cijepanje proteina. Stanice se ispiru tripsinom u svrhu omogućavanja njihovog međusobnog odvajanja kao i njihovog odvajanja od same podloge. Nakon ispiranja tripsinom stanice su inkubirane 5 minuta kako bi se odlijepile od podloge te im je zatim dodano 9 mL svježje tekuće podloge DMEM HG. Nakon toga je po 1 mL takve otopine prenesen u nove plastične posudice sa stanicama HEK-293 kojima je prethodno uklonjen medij. Stanice su zatim resuspendirane s PBS-om nakon čega je isti uklonjen. U svaku od plastičnih posuda potom je dodano po 9 mL svježeg hranjivog medija DMEM te su potom inkubirane 48 sati pri 37°C i 5% CO₂.

Nakon 48 sati u svrhu infekcije virusnim lizatom, korištene su HEK-293 stanice koje su dostigle konfluentnost od 80%. Prvo je adenovirus zamrznut pri temperaturi od -20°C i odmrznut pri 37°C kroz 3 ciklusa, kako bi se oslobodile virusne čestice iz stanica. U plastične posude sa stanicama HEK-293 dodan je adenovirus u čijoj se okosnici nalazi divlji tip gena koji kodira za receptor TLR5 ukupnog volumena od 10 µL u prvu, 20 µL u drugu, 50 µL u treću i 100 µL u četvrtu plastičnu posudu. Paralelno je u plastične posude dodan adenovirus u čijoj se okosnici nalazi mutirani, N592S tip gena koji kodira za receptor TLR5 ukupnog volumena od 10 µL u prvu, 20 µL u drugu, 50 µL u treću i 100 µL u četvrtu plastičnu posudu.

Ovako transficirane stanice inkubirane su 48 sati u inkubatoru pri 37°C i 5%-tnim CO₂.

Nakon 48 sati inkubacije stanični sadržaji plastičnih posuda za uzgoj stanica s zajedno s hranjivim medijem pomiješani su u jednu epruvetu od 50 mL za divlji tip gena koji kodira za receptor TLR5, odnosno drugu epruvetu od 50 mL za mutirani tip gena koji kodira za receptor TLR5 koje su potom spremljene na -20°C.

HEK-293 stanice koje se nalaze u 40 plastičnih posuda, a koje su dostigle 70-80% konfluentnosti inficirane su s po 20 µL adenovirusa u čijoj se okosnici nalazi divlji tip gena koji kodira za receptor

TLR5. Postupak je ponovljenu novih 40 plastičnih posuda s HEK-293 stanicama, ali sada s po 20 μ L adenovirusa u čijoj se okosnici nalazi mutirani tip gena koji kodira za receptor TLR5.

U svrhu replikacije virusa inkubirane su inficirane stanice u trajanju od 72 sata na 37°C. Nakon 72 sata 50% stanica je bilo zalijepljeno, a 50% odljepljeno s vidljivim citopatološkim učinkom (engl. *cytopathiceffect*, CPE). Laganim lupkanjem o plastičnu posudu, stanice su odvojene od podloge i sadržaj plastičnih posuda je skupljen u epruvete od 50 mL. Epruvete su centrifugirane 10 minuta pri 750 x g u svrhu odvajanja hranjivog medija od taloga. Talosi s adenovirusnim vektorom u čijoj se okosnici nalazi gen *TLR5*^{wt} su potom resuspendirani i prebačeni u ukupnom volumenu od 8 mL u epruvetu od 10 mL te spremljeni na -20°C do izolacije i pročišćavanja.

Isti postupak ponavljen je i s HEK-293 stanicama transfeciranim s adenovirusnim vektorom u čijoj se okosnici nalazi gen koji kodira *TLR5*^{N592S}.

3.2.17. Pročišćavanje adenovirusnih vektora

U svrhu pročišćavanja adenovirusnog vektora iz dobivenog lizata radi uklanjanja ostataka stanica kao i praznih virusnih kapsida provedeno je ultracentrifugiranje na jastučiću celzijevog klorida i kasnije u gradijentu cezijevog klorida.

U svrhu pročišćavanja virusa, tri otopine cezijevog klorida pripremljene su u TD puferu, gustoće 1,25 g/mL, 1,34 g/mL i 1,40 g/mL. Pročišćavanje virusa izvedeno je u dva koraka u laminaru. U prvom koraku u dvije epruvete za centrifugu T880 od 11 mL je stavljeno po 2,4 mL cezijevog klorida gustoće 1,40 g/mL te nadslojeno ispuštanjem tekućine pipetom niz stijenk u epruvete za centrifugu kap po kap s po 2,4 mL ml cezijevog klorida gustoće 1,25 g/mL. Na smjese je dodano po 4 mL adenovirusnog vektora u čijoj se okosnici nalazi gen koji kodira za divlji tip receptora TLR5 te su potom epruvete za centrifugu do vrha nadopunjena s DPBS-om. Postupak je ponovljen u dvije nove epruvete za centrifugu, ali s adenovirusnim vektorom u čijoj se okosnici nalazi gen *TLR5*^{N592S}. Uzorci su centrifugirani u rotoru SW41 Ti, ultracentrifugirke Beckman u trajanju od 90 minuta pri 35 000 x g. Nakon centrifugiranja uzorci su izvađeni iz nosača i stalaka i preneseni u laminar te postavljeni na plastični stalak ispred tamne pozadine. Čestice virusa bile su vidljive kao prstenasti sloj između dviju otopina cezijevog klorida različitih gustoća. Virus je iz otopine cezijevog klorida izdvojen ubadanjem sterilne igle do malo iznad linije virusa te prebačen u čistu epruvetu time da je iz svake tube za centrifugu preneseno po 1 mL virusa.

U drugom koraku centrifugiralo se u gradijentu cezijeveg klorida tako što je u epruvetama koje sadrže po 2 mL virusa pročišćenog na jastučiću cezijeveg klorida stavljeno 9 mL cezijeveg klorida gustoće 1,34 g/mL. Epruvete za centrifugu su ekvilibrirane na vagi dodavanjem otopine cezijeveg klorida gustoće 1,34 g/mL. Uzorci su pričvršćeni u stalak i nosač te stavljeni na ultracentrifugiranje 20 sati pri 35 000 x g, 20°C. Centrifugiranjem nastaje gradijent cezijeveg klorida, a virus se zaustavlja na mjestu u kojem je gustoća cezijeveg klorida jednaka gustoći virusnih čestica i vidi se oko polovice epruvete za centrifugu kao bijeli trag. Virus iz cezijeveg klorida u ukupnom volumenu od 1 mL izvađen je iglom prema gore opisanom postupku i prebačen u čistu 1,5 mL epruvetu. U svrhu uklanjanja otopine cezijeveg klorida iz pročišćenih adenovirusa korištena je kolona *Column PD-10 Sphadex G-25M, Amersham Pharmacia Biotech Cat.No. 17-0851-01*. Kolona se pričvrstila na metalni stalak nakon čega joj je vrh odrezan škarama kako bi tekućina iz nje iscurila te se potom kolona isprala 6 puta s po 5 mL DPBS-a. Sljedeći korak bio je dodavanje virusa u ukupnom volumenu od 1 mL na kolonu i skupljanje eluata. Potom je slijedilo skupljanje sljedećih eluata dodavanjem DPBS-a na kolonu u volumenima od 500 µL za eluat 1, 2, 3, 4, 250 µL DPBS-a za eluate 5 i 6, 500 µL DPBS-a za eluat 7 i 250 µL DPBS-a za eluate 8, 9, 10.

Frakcije 5, 6, 7, 8 odgovarale su frakcijama u kojima se nalaze adenovirusi zbog toga što su mutne i konkavne u odnosu na frakcije u kojima nema virusa. Potom je virusima dodan glicerol tako da bude prisutan u konačnoj otopini 10%. Pročišćeni virusi su alikvotirani i uskladišteni na -80°C do upotrebe.

3.2.18. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Određivanje ukupnog broja virusnih čestica vrši se mjerenjem apsorbancije pri 260nm. Ova spektrofotometrijska metoda se koristi samo za pročišćeni virus.

U svrhu određivanja koncentracije adenovirusnih čestica pripremljena su razrjeđenja pročišćenih adenovirusa (Ad5-TLR5^{wt} i Ad5-TLR5^{N592S}) 10x i 20x u otopini PBS-a (sastava: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ i 1,4 mM KH₂PO₄, pri pH 7,4) i 0,1%-tnog SDS-a (natrijev dodecilsulfat). Otopine su potom inkubirane 10 minuta u termobloku pri 56°C u svrhu oslobađanja virusne DNA iz kapsida. Potom su virusni pripravci centrifugirani pri 10 000 x g u vremenu trajanja od 30 sekundi i supernatant prebačen u nove 1,5 mL epruvete. Potom su izmjerene apsorbancije pri 260 nm prema otopini PBS-a i 0,1%-tnog SDS-a.

Broj virusnih čestica izračunat je prema formuli:

$$N = A_{260} \times R \times 1,1 \times 10^{12},$$

gdje je: N– broj virusnih čestica u mL, A_{260} – izmjerena apsorbancija pri 260 nm, R– razrjeđenje.

3.2.19. Zaražavanje stanica A549, WI38 i H1299

U svrhu infekcije virusnim česticama humane stanične linije epitelnog podrijetla iz karcinoma pluća A549, zdravih fibroblasta epitelnog podrijetla iz tkiva pluća WI38, raka pluća ne-malih stanica H1299, nasađene su u plastične pločice s 12 bunarića tako što je u svakom bunariću nasađeno 200 000 stanica. Stanice su inkubirane preko noći pri 37°C i 5%-tnim CO₂ nakon čega je po bunariću dodan 1 mL svježeg DMEM medija. Stanice su potom inficirane virusnim česticama tako što je u bunariće sa svakom staničnom linijom dodano 5 000, 10 000 odnosno 30 000 virusnih čestica i inkubirano 90 minuta.

Volumen virusnih čestica koji je potrebno dodati stanicama izračunat je prema formuli:

$$V \text{ (virusne čestice, } \mu\text{L)} = \frac{N(\text{stanice}) \cdot N(\text{bunarić}) \cdot \text{MOI}}{c(\text{matična otopina})},$$

Gdje je: MOI- ukupni broj virusnih čestica po stanici, c (matična otopina) – koncentracija matične otopine tako da 1 μL otopine sadrži 1×10^9 virusnih čestica.

Infekcija stanica u jednom slučaju provedena je s Ad5-TLR5^{wt}, a u drugom s Ad5-TLR5^{N592S}. Poslije inkubacije stanicama je promijenjen medij te su vraćene u inkubator u trajanju od 48 sati.

Nakon 48 sati inkubacije stanicama je uklonjen medij i po bunariću dodan prethodno zagrijani na 96°C, pufer *Hot lysis Laemmli* 1x u volumenu od 200 μL . Uzorci su potom sonificirani, vorteksirani i kuhani na 95°C 10 minuta.

3.2.20. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforeza je denaturirajuća elektroforeza jer se narušava nativna struktura analiziranih proteina djelovanjem određenih reagensa. Prije samog nanošenja uzorci proteina miješaju se s puferom za nanošenje na gel koji sadrži natrij dodecil sulfat (SDS) kao i β -merkaptoetanol, reducirajući reagens. SDS omogućuje disocijaciju proteinskih podjedinica i narušava terciarnu strukturu proteina. β -merkaptoetanol omogućuje redukciju disulfidnih veza između polipeptidnih lanaca čime narušava sekundarnu strukturu proteina. Natrij dodecil sulfat daje negativan naboj svim proteinima i njegovim stupanjem u kompleks s polipeptidnim lancima

oni zauzimaju oblik nasumičnog klupka. Proteini se na gelu odjeljuju isključivo na temelju njihove molekulske mase zbog maskiranja naboja bočnih aminokiselinskih ogranaka vezanjem SDS-a na proteine u stalnom omjeru po jedinici mase.

3.2.21. Analiza Western blot

Analiza Western blot je tehnika za razdvajanje, identifikaciju i određivanje prisutnosti proteina na temelju njihove molekulske mase. Određena masa proteina nanosi se na poliakrilamidni gel na kojem putuju pod djelovanjem napona tako što oni proteini manje molekulske mase putuju brže dok oni veće molekulske mase putuju sporije. Nakon provedene elektroforeze na poliakrilamidnom gelu razdvojeni proteini s gela se prebacuju na membranu pod utjecajem istosmjernje električne struje. Nakon prijenosa, membrana se blokira zasićenjem proteinima kao što su albumin goveđeg seruma ili obranim mlijekom u prahu u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja antitijela. Proteini se potom inkubiraju u otopini sa specifičnim primarnim antitijelom za određeni protein. Konačno slijedi detektiranje proteina kao i određivanje njihovog položaja na membrani vezanjem sekundarnih antitijela koja sadrže kovalentnu vezanu molekulu enzima čiji se signali registriraju kolorimetrijom ili kemiluminiscencijom.

U svrhu pripreme gelova za SDS-PAGE elektroforezu pripremljene su otopine za 10%-tne gelove za razdvajanje (donji gelovi) i 5%-tne gelove za sabijanje (gornji gelovi). Nakon pripremljenih otopina, smjesa gela za razdvajanje izlivena je između dva stakalca pričvršćenih na postolje. U svrhu sprječavanja pristupa atmosferskom kisiku koji bi onemogućio polimerizaciju gela na otopinu gela se dodala otopina izopropanola u trajanju od 40 minuta. Nakon polimerizacije, izopropanol je izliven i rub gela je ispran redestiliranom vodom te je potom na njega nanescena smjesa gela za sabijanje. Odmah nakon nanošenja gela za sabijanje umetnut je češljic za formiranje jažica i gel je polimerizirao u vremenu trajanja 60 minuta.

Nakon polimerizacije gela u svrhu nanošenja uzoraka na gel radi dokazivanja uspješnosti infekcije staničnih linija A549, WI38, H1299 virusnim česticama, 20 μ L uzoraka proteinskog ekstrakta inkubirano je u termobloku u trajanju od 5 minuta na 96°C. Nakon inkubacije uzorci su nanesceni na poliakrilamidni gel u svrhu provođenja elektroforeze za svaku staničnu liniju za sedam uzoraka: neinficirani uzorak, uzorak inficiran s 5 000, 10 000 i 30 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt}, uzorak inficiran s 5 000, 10 000 i 30 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{N592S}. Kao marker molekulskih masa

korišten je *PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)*, a elektroforeza se provela u uređaju za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad) pri 160 V po gelu, u trajanju od 45 minuta.

U svrhu prijenosa proteina s gela na PVDF membranu korišten je uređaj *TranBlot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad)*. Prije samog prijenosa membrana je aktivirana metanolom u trajanju od 60 sekundi i zatim isprana u trajanju od 60 sekundi u mqH_2O . Membrana je postavljena na filter papire ekvilibrirane u puferu za transfer, a na njih se postavio gel na kojemu se također nalaze filter papiri. Potom se tako složena kasetna u svrhu transfera postavila u uređaj u kojemu transfer traje 7 minuta, a vrši se pri 2 500 mA.

Prije samog postupka blokiranja pripremila se 5%-tna otopina mlijeka u prahu otapanjem u puferu PBS-T na magnetnoj miješalici. Membrana se postavila u plastičnu posudicu u koju se dodao volumen pripremljene 5%-tne otopine mlijeka u prahu koji je dovoljan da prekrije membranu. Potom se membrana inkubirala pri sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta uz miješanje. Nakon blokiranja, membrana se inkubirala na 4°C preko noći u pripremljenoj otopini primarnog mišjeg monoklonskog anti-HA antitijela uz miješanje na tresilici. Otopina primarnog antitijela pripremila se razrjeđenjem 20 μ L izvorne otopine antitijela u 10 mL 5%-tne otopine mlijeka u prahu. Sljedeći dan membrana je tri puta isprana u puferu PBS-T u trajanju od 15 minuta uz miješanje pri sobnoj temperaturi. Membrana se potom inkubirala u otopini sekundarnog anti-mišjeg imunoglobulin G antitijela s konjugiranom peroksidazom, u vremenu trajanja od 60 minuta. Otopina sekundarnog antitijela pripremila se razrjeđenjem 5 μ L izvorne otopine antitijela u 5 mL 5%-tne otopine mlijeka u prahu. Nakon provedene inkubacije membrana se ponovno ispirala tri puta u trajanju od 15 minuta u otopini PBS-T.

U svrhu dokazivanja uspješnosti infekcije staničnih linija A549, WI38, H1299 virusnim česticama i detekcije proteinske vrpce HA proteina na PVDF membrani korišten je kemiluminescentni reagens Luminol. U ovom radu korišten je komercijalno dostupan komplet za detekciju *Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad)*. Prije same detekcije pomiješala se otopina reagensa A s otopinom reagens B u omjeru 1 : 1 i takvom smjesom potom se prekrila membrana. Reagens A predstavlja otopinu luminola, a reagens B predstavlja otopinu peroksida. Membrana se potom inkubirala u trajanju od 5 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega se višak otopine uklonio s membrane koja se potom uslikala uređajem *C-Digit® Blot Scanner* s ekspozicijom u trajanju od 12 minuta.

4. REZULTATI

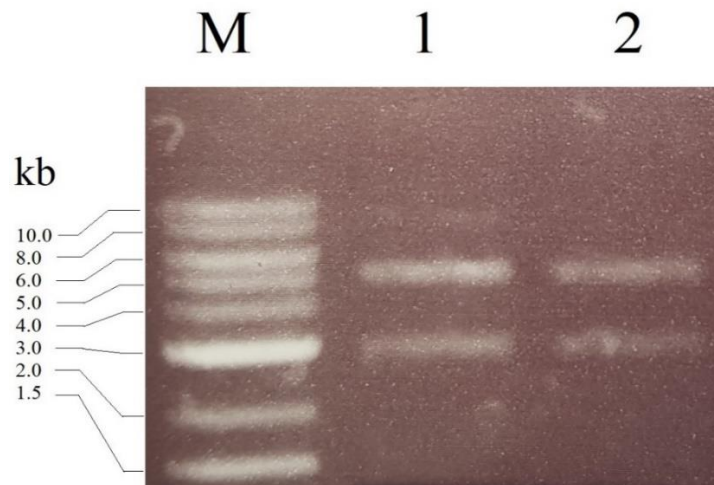
4.1. Priprema inserata $TLR5^{wt}$ i $TLR5^{N592S}$ za kloniranje u vektor pShuttle-CMV

Prvi dio ovoga eksperimenta bio je uklonirati gen koji kodira za divlji tip receptora TLR5 i njegov mutirani oblik, N592S tip u vektor pShuttle-CMV.

U tu svrhu vektor pShuttle-CMV pocijepan je s restrikcijom endonukleazom *EcoRV*.

Slijedeći korak obuhvaćao je izrezivanje inserata koji kodiraju za divlji tip receptora TLR5 i njegov mutirani oblik, N592S tip iz ekspresijskih klonova pcDNA3.1 hTLR5^{wt} kao i pcDNA3.1 hTLR5^{N592S} restrikcijom endonukleazom *PmeI*.

U svrhu provjere uspješnosti hidrolize fosfodieterske veze okosnice DNA potom je provedena metoda elektroforeze postavljanjem pripremljenih restrikcijom smjesa na agarozni gel (Slika 9).



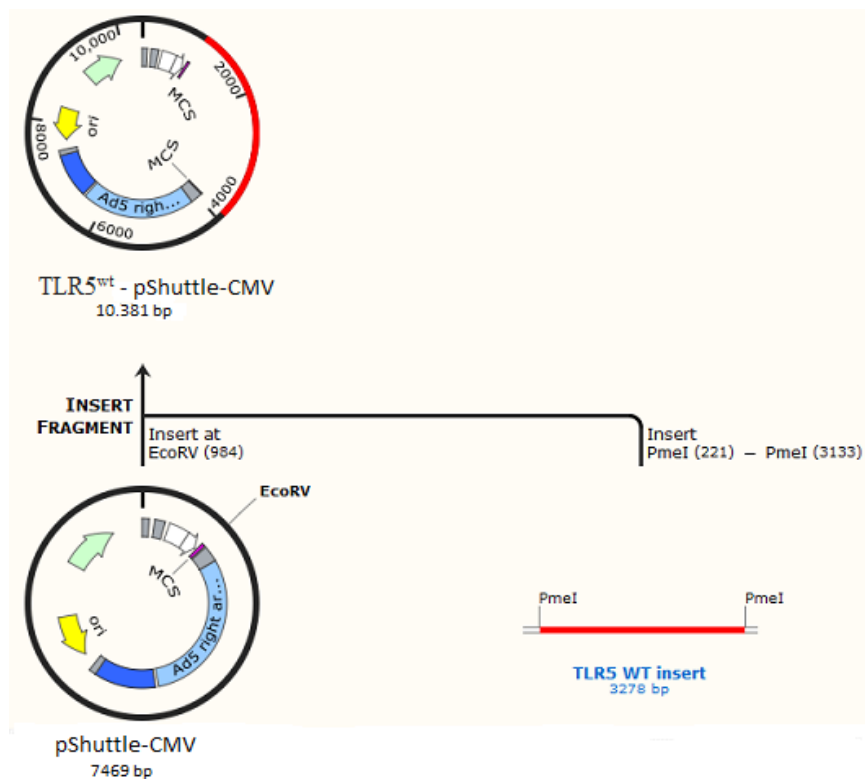
Slika 8: Elektroforeza na agaroznom gelu nakon razgradnje s restrikcijom endonukleazom *PmeI*. Na gel je nanesen marker molekularnih masa (M), uzorci pcDNA3.1 hTLR5^{wt} i pcDNA3.1 hTLR5^{N592S} tretirani s enzimom *PmeI* (1, 2).

U jažicama 2 i 3 vidljive su vrpce veličine oko 2.9 kb koje bi odgovarale insertima koji kodiraju gen $TLR5^{wt}$ odnosno $TLR5^{N592S}$, a vrpce od oko 5 kb odgovarale bi uzorcima pcDNA3.1 hTLR5^{wt} i pcDNA3.1 hTLR5^{N592S} bez inserta koji kodiraju gen $TLR5^{wt}$ odnosno $TLR5^{N592S}$.

4.2. Metoda ligacije i amplifikacije ligiranih produkata

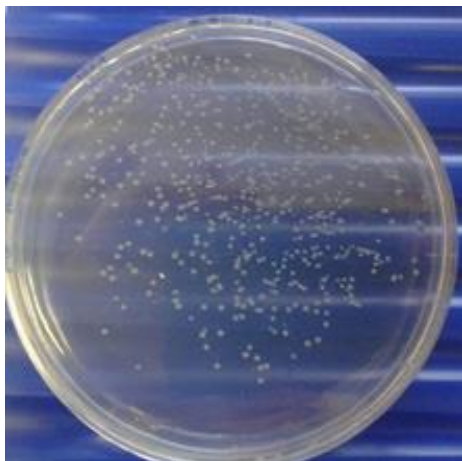
U svrhu ligacije inserata koji kodiraju gen $TLR5^{wt}$ i $TLR5^{N592S}$ u vektor pShuttle-CMV na spektrofotometru su očitane masene koncentracije uzoraka koje su potrebne za podešavanje omjera

inserta ($TLR5^{wt}$ i $TLR5^{N592S}$) i vektora pShuttle-CMV u odnos 5 : 1. Očitane masene koncentracije su iznosile 5,74 ng/ μ L za insert koji kodira gen $TLR5^{wt}$, 6,71 ng/ μ L za insert koji kodira gen $TLR5^{N592S}$ i 20 ng/ μ L za vektor pShuttle-CMV. Produkt ligacije inserta koji kodira za $TLR5^{wt}$ u vektor pShuttle-CMV vidljiv je na Slici 10.

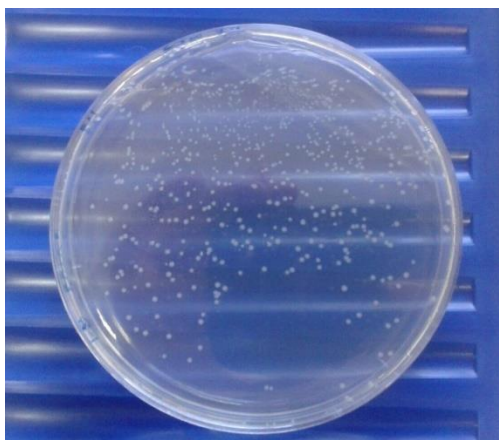


Slika 9: Produkt ligacije inserta koji kodira gen $TLR5^{wt}$ prethodno tretiran s restriksijskom endonukleazom *PmeI* u vektor pShuttle-CMV prethodno tretiranog enzimom *EcoRV*. Slika je rekonstruirana programskim alatom *SnapGene™ 1.1.3*.

U svrhu amplifikacije konstrukta pShuttle-CMV- $TLR5^{wt}$ i pShuttle-CMV- $TLR5^{N592S}$ provoden je postupak transformacije kompetentnih bakterijskih stanica DH5- α s prethodno pripremljenim ligacijskim smjesama (Slike 11 i 12).



Slika 10: Prekonoćne bakterijske kulture transformiranih kolonija DH5- α koje sadrže željeni fragment koji kodira gen za divlji tip receptora TLR5.



Slika 11: Prekonoćne bakterijske kulture transformiranih kolonija DH5- α koje sadrže željeni fragment koji kodira gen za mutirani oblik receptora TLR5, N592S tip.

4.3. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli*

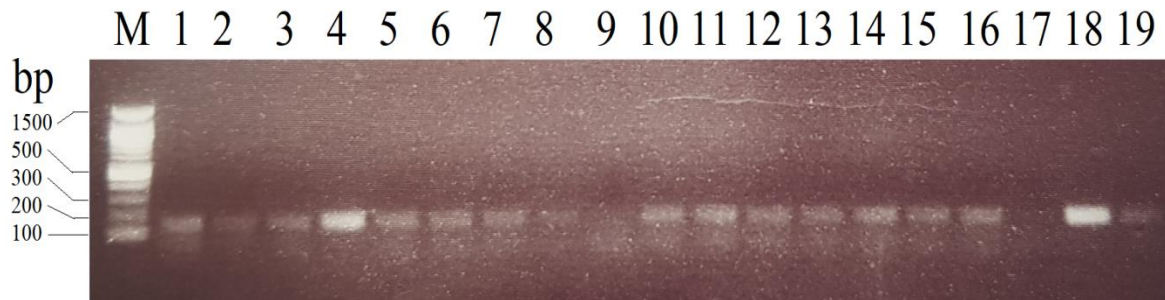
U svrhu izolacije konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 kojim su bakterije DH5- α prethodno transformirane, prekonoćne bakterijske kulture 40 odabranih klonova uzgojene su u tekućoj LB hranjivoj podlozi. Nakon izolacije plazmidnih DNA metodom „mini-prep“, na spektrofotometru su očitane njihove masene koncentracije te izračunate srednje masene koncentracije (Tablica 5).

Tablica 5: Srednje vrijednosti masenih koncentracija izolirane DNA (pShuttle-CMV-TLR5^{wt}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S})

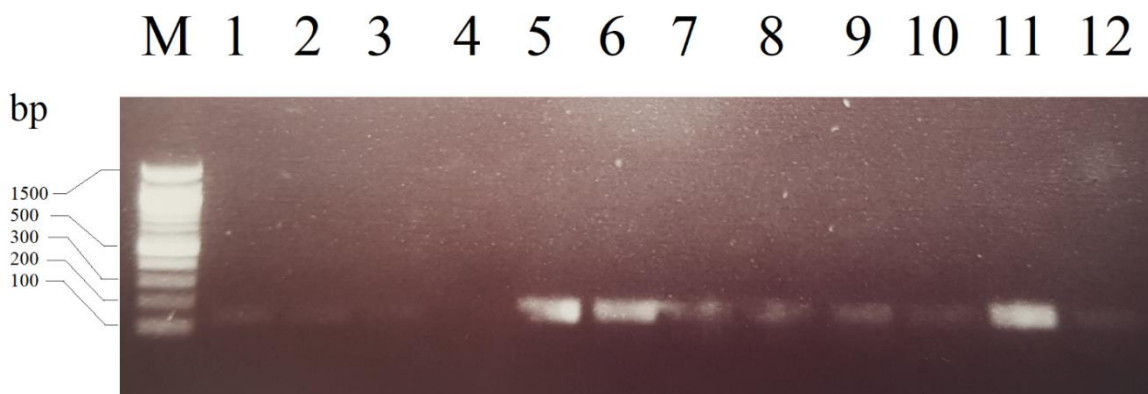
Uzorak TLR5	\bar{y} (ng/ μ L)	Uzorak TLR5	\bar{y} (ng/ μ L)
Wt-1	259,7	N592S-1	678,74
Wt-2	347,8	N592S-2	462,35
Wt-3	289,17	N592S-3	571,20
Wt-4	518,44	N592S-4	849,38
Wt-5	481,80	N592S-5	636,9
Wt-6	651,5	N592S-6	724,59
Wt-7	944,81	N592S-7	555,90
Wt-8	887,55	N592S-8	649,26
Wt-9	521,60	N592S-9	686,92
Wt-10	427,59	N592S-10	592,24
Wt-11	685,25	N592S-11	536,33
Wt-12	60,24	N592S-12	630,73
Wt-13	536,93	N592S-13	864,09
Wt-14	350,09	N592S-14	415,48
Wt-15	295,09	N592S-15	60,00
Wt-16	430,17	N592S-16	625,74
Wt-17	647,99	N592S-17	804,04
Wt-18	133,34	N592S-18	750,71
Wt-19	365,35	N592S-19	687,54
Wt-20	782,64	N592S-20	595,99

Nakon izolacije plazmidne DNA u svrhu potvrde ligacije inserta koji kodira gen *TLR5*^{wt}, odnosno inserta koji kodira gen *TLR5*^{N592S} u vektor pShuttle-CMV korištena je metoda PCR. Poslije provedene PCR reakcije produkti iste nanose se na 1,5%-tni agarozni gel (Slika 13).

Rezultati umnažanja PCR produkata radi potvrde uspješne ligacije prikazani su na Slikama 13 i 14. Na slikama su bile vidljive vrpce koje su odgovarale produktima reakcije PCR od 143 parova baza za uzorke pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-1}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-10}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-11}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-4}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6}.



Slika 12: Produkti PCR reakcije. Elektroforeza na agaroznom gelu plazmida izoliranih iz 17 različitih bakterijskih kolonija. Marker molekulskih masa (M), plazmidi iz različitih bakterijskih kolonija (pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-1} - pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-17} (1-17), pcDNA3.1 hTLR5^{wt} (18), negativna kontrola (19)).



Slika 13: Produkti PCR reakcije. Elektroforeza na agaroznom gelu plazmida izoliranih iz 10 različitih bakterijskih kolonija. Marker molekulskih masa (M), plazmidi iz različitih bakterijskih kolonija (pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-18} (1), pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-19} (2), pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-20} (3), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-2} (4), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-4} (5), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} (6), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-8} (7), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-9} (8), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-18} (9), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-20} (10), pcDNA3.1 hTLR5^{wt} (11), negativna kontrola (12)).

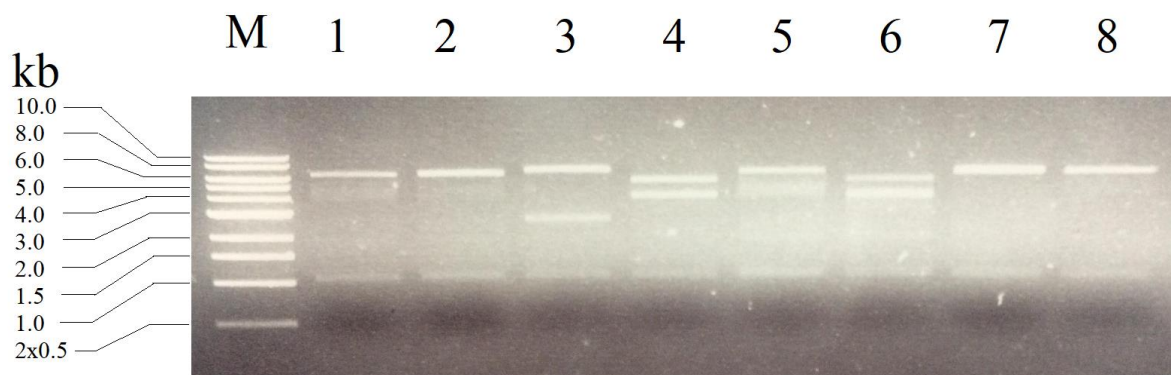
4.4. Razgradnja konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 restrikcijским enzimima *PmeI* i *BamHI*

U svrhu potvrde uspješne ligacije inserata koji kodiraju gen za *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} u vektor pShuttle-CMV provedena je razgradnja potencijalnih konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 pomoću restrikcijских endonukleaza *PmeI* i *BamHI*. Prije pripreme restrikcijских reakcija na spektrofotometru su očitane masene koncentracije konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 te izračunate njihove srednje masene koncentracije (Tablica 6).

Tablica 6: Srednje vrijednosti masenih koncentracija uzoraka pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-1}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-10}, pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-11} i pShuttle-CMV-TLR5^{wt-4}, pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6}.

Uzorak	\bar{y} (ng/ μ L)
TLR5 ^{N592S-1}	622,38
TLR5 ^{N592S-4}	786,73
TLR5 ^{N592S-10}	748,45
TLR5 ^{N592S-11}	720,635
TLR5 ^{wt-4}	720,635
TLR5 ^{wt-6}	695,94

U svrhu provjere uspješnosti hidrolize fosfodieterske veze okosnice DNA provedena je metoda elektroforeze postavljanjem pripremljenih restrikcijskih smjesa potencijalnih konstrukata pShuttle-CMV-TLR5 na agarozni gel. Na agaroznom gelu bile su jasno vidljive vrpce za uzorke pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} prethodno tretiranih restrikcijskim enzimima *PmeI* i *BamHI*, što je bila potvrda uspješne reakcije ligacije. Za uzorak TLR5^{wt-6} vidljive su tri vrpce od 5413 bp, 3931 bp i 1037 bp, a za uzorak TLR5^{N592S-4} vidljive su vrpce veličine 5431 bp, 3931 bp i 1037 bp (Slika 15).



Slika 14: Elektroforeza na agaroznom gelu uzoraka pShuttle-CMV-TLR5^{wt-3} (1), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-10} (2), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-4} (3), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} (4), pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-1} (5), pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} (6), pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-10} (7), pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-11} (8) prethodno tretiranih restrikcijskim endonukleazama *PmeI* i *BamHI*, marker molekulske masa (M).

Plazmidi pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} su uzgojeni i izolirani metodama mini-prep i midi-prep nakon potvrđene uspješne ligacije. Potom je očitana masena koncentracija izoliranih DNA pri 260 nm na spektrofotometru i izračunata njihova srednja masena koncentracija (Tablica 7).

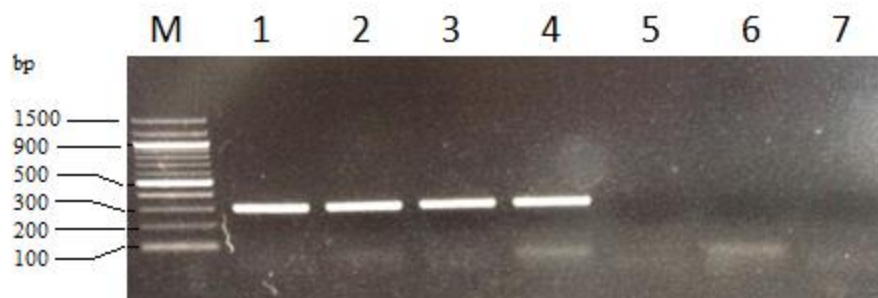
Tablica 7: Srednje vrijednosti masenih koncentracija plazmida pShuttle-CMV-TLR5^{WT-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} nakon izolacije.

Uzorak	\bar{y} (ng/ μ L)
TLR5 ^{wt-6} mini-prep	83,90
TLR5 ^{N592S-4} mini-prep	80,39
TLR5 ^{wt-6} midi-prep	334,04
TLR5 ^{N592S-4} midi-prep	278,38

4.5. Provjera ligacije inserata *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}* s vektorom pShuttle-CMV

U svrhu potvrde ligacije i pravilne orijentacije inserta koji kodiraju gen za *TLR5^{wt}*, odnosno *TLR5^{N592S}* s vektorom pShuttle-CMV korištena je metoda PCR.

Rezultati umnažanja PCR produkata radi potvrde uspješne ligacije prikazani su na Slici 16. Iz slike se ističu vrpce uzoraka mini-prep kao i midi-prep za konstrukte pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} koje odgovaraju produktima PCR reakcije od 316 parova baza što je bila potvrda uspješne ligacije kao i orijentacije inserta.



Slika 15: Produkti reakcije PCR: plazmidi uzoraka mini-prep pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} (1), pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} (2), pShuttle-CMV-TLR5^{wt-3} (5) i pShuttle-CMV-TLR5^{wt-10} (6) uzoraka midi-prep pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} (3) i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} (4), marker molekulskih masa (M). Gel sadrži produkt PCR reakcije veličine 316 parova baza DNA na jažicama; 1,2,3,4 što je potvrda za uspješnu ligaciju inserta za pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4}.

4.6. Homologna rekombinacija u svrhu dobivanja rekombinantnih virusa

U svrhu dobivanja rekombinantnog virusa homolognom rekombinacijom između konstrukta pShuttle-CMV-TLR5 i genoma Ad5, stanična linija BJ5183-AD-1 transformirana je konstruktima pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4}, prethodno lineariziranih restriksijskom endonukleazom *PmeI* postupkom elektroporacije. Rekombinantni virus konstruiran je *in vivo* manipulacijom Ad5 genoma kao plazmida u bakteriji *Escherichia coli* pri čemu je došlo do homologne rekombinacije između vektora pShuttle-CMV-TLR5 i adenovirusnog vektora pAdEasy-1 u bakterijskom soju *Escherichia coli*, BJ5183-AD-1 kojoj posreduju lijeva ruka (engl. *Left arm*) i desna ruka (engl. *Right arm*) homologije.

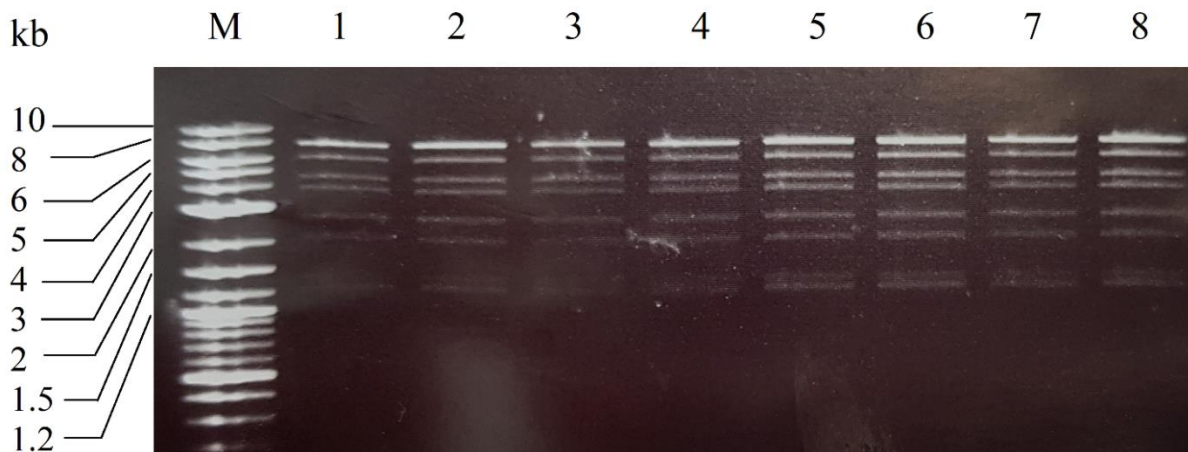
Prekonoćne bakterijske kulture 20 odabranih klonova uzgojene su u tekućoj hranjivoj podlozi LB u svrhu izolacije plazmida pShuttle-CMV-TLR5^{wt-6} i pShuttle-CMV-TLR5^{N592S-4} kojim su bakterije BJ5183-AD-1 prethodno transformirane. Nakon izolacije plazmidnih DNA metodom „mini-prep“ na spektrofotometru su očitane masene koncentracije izolirane DNA te izračunate njihove srednje masene koncentracije (Tablica 8).

Tablica 8: Na spektrofotometru očitane masene koncentracije izolirane DNA 20 uzoraka Ad5-TLR5.

Uzorak	γ (ng/ μ L)	uzorak	γ (ng/ μ L)
Ad5-TLR5 ^{wt-1}	349,6	Ad5-TLR5 ^{N592S-1}	314,7
Ad5-TLR5 ^{wt-2}	372,6	Ad5-TLR5 ^{N592S-2}	301,0
Ad5-TLR5 ^{wt-3}	282,1	Ad5-TLR5 ^{N592S-3}	239,7
Ad5-TLR5 ^{wt-4}	430,7	Ad5-TLR5 ^{N592S-4}	264,9
Ad5-TLR5 ^{wt-5}	322,6	Ad5-TLR5 ^{N592S-5}	189,9
Ad5-TLR5 ^{wt-6}	432,1	Ad5-TLR5 ^{N592S-6}	470,9
Ad5-TLR5 ^{wt-7}	401,0	Ad5-TLR5 ^{N592S-7}	354,7
Ad5-TLR5 ^{wt-8}	337,9	Ad5-TLR5 ^{N592S-8}	420,9
Ad5-TLR5 ^{wt-9}	334	Ad5-TLR5 ^{N592S-9}	336,36
Ad5-TLR5 ^{wt-10}	169,5	Ad5-TLR5 ^{N592S-10}	378,2

U svrhu amplifikacije konstrukata Ad5-TLR5 u bakteriji *Escherichia coli*, bakterije DH5- α su kemijski transformirane plazmidnom DNA. Prekonoćne bakterijske kulture 8 kolonija uzgojene su u tekućoj LB hranjivoj podlozi radi izolacije plazmida. Nakon izolacije plazmidnih DNA očitana masena koncentracija za konstrukt prve kolonije Ad5-TLR5^{wt-3} je iznosila 1019,05 ng/ μ L, a druge kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{wt-3} 1094,78 ng/ μ L, prve kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{wt-8} 1005,75 ng/ μ L, a druge kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{wt-8} 1025,22 ng/ μ L, prve kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{N592S-4} 1011,98 ng/ μ L, a druge kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{N592S-4} 1110,55 ng/ μ L, 1036,57 ng/ μ L za uzorak prve kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{N592S-3} dok je druge kolonije konstrukta Ad5-TLR5^{N592S-3} iznosila 1005,81 ng/ μ L.

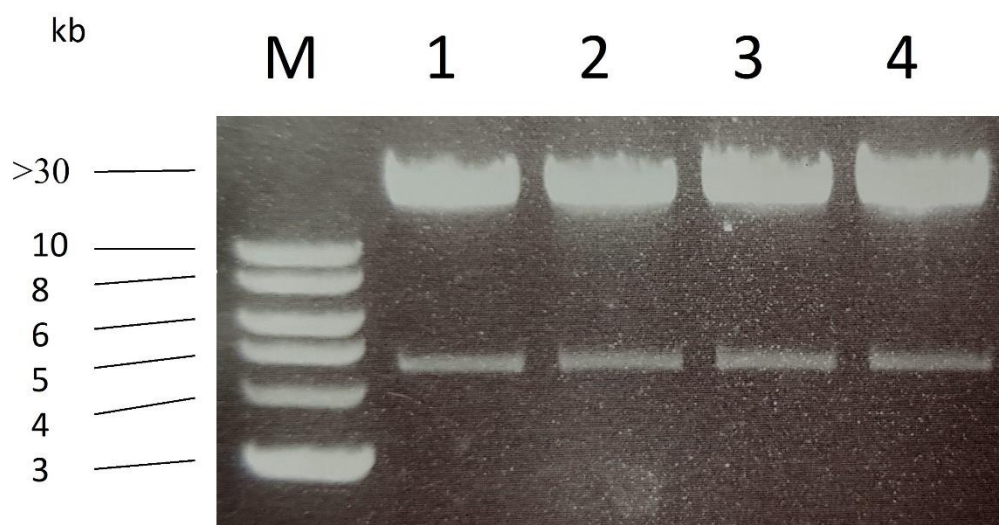
Svih 8 uzoraka potom je podvrgnuto restrikciji pomoću restrikcijske endonukleaze *EcoRV*, a produkti restrikcije provjereni su elektroforezom na 0,8%-tnom agaroznom gelu (Slika 17). Na gelu su uočene vrpce koje odgovaraju pAdEasy-1 (gornjih 6 vrpce) i plazmidu pShuttle-CMV (donje dvije vrpce). Vrpce koje odgovaraju pAdEasy-1 veličine su 11560 bp, 7637 bp, 4545 bp, 3828 bp, 2617 bp, 2052 bp i 1238 bp. Vrpce koje odgovaraju plazmidu Shuttle-CMV veličine su 7741 bp, 1383 bp, 1258bp.



Slika 16: Elektroforeza na agaroznom gelu uzoraka Ad5-TLR5^{wt-3} (1, 2), Ad5-TLR5^{wt-8} (3, 4), Ad5-TLR5^{N592S-3} (5, 6), Ad5-TLR5^{N592S-4} (7, 8) tretiranih s restriksijskom endonukleazom *EcoRV*. Na agarozni gel nanesen je i marker molekulskih masa (M).

4.7. Povrda uspješne homologne rekombinacije

U svrhu potvrde uspješne homologne rekombinacije između BJ5183-AD-1 stanica i konstrukta pShuttle-CMV-TLR5^{wt} odnosno pShuttle-CMV-TLR5^{N592S} provedena je restriksijska reakcija s restriksijskom endonukleazom *PacI* za uzorke prvih kolonija Ad5-TLR5^{wt-3} i Ad5-TLR5^{N592S-3}. Produkti restrikcije naneseni su na 1%-tni agarozni gel, a dobivene vrpce odgovarale su veličinama od >30 kb i 4,5 kb (Slika 18).

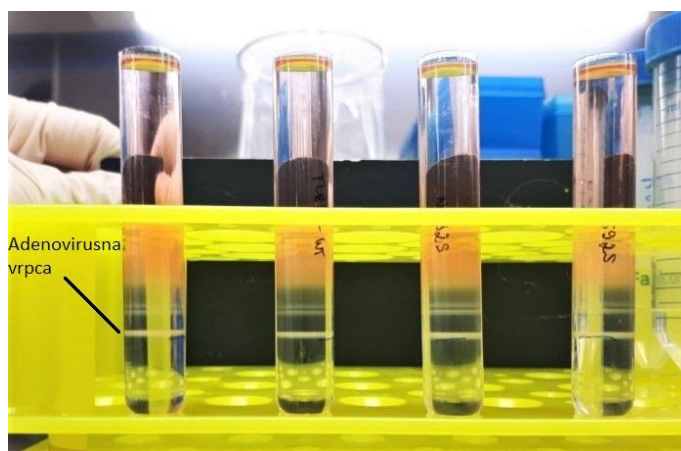


Slika 17: Elektroforeza na agaroznom gelu uzoraka Ad5-TLR5^{wt-3} (1, 2) i Ad5-TLR5^{N592S-3} (3, 4) tretiranih s restriksijskom endonukleazom *PacI*. Na agarozni gel nanesen je i marker molekulskih masa (M).

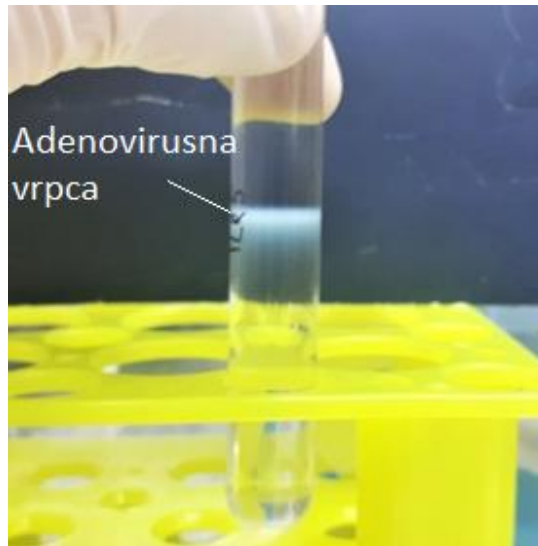
4.8. Dobivanje, umnažanje i pročišćavanje virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt} i Ad5-TLR5^{N592S}

U svrhu dobivanja adenovirusnih čestica, prethodno linearizirani konstrukti Ad5-TLR5^{wt} i Ad5-TLR5^{N592S} restrikcijom endonukleazom *PacI* transfekcijom su uneseni u kulturu bubrežnih stanica ljudskog embrija, HEK-293. Komplementacijom u staničnoj liniji HEK 293 stvaraju se virusne čestice zato što su rekombinantni vektori deficitarni u regiji E1A koji su odgovorni za replikaciju virusnog genoma. Nadalje, stanična linija HEK-293 omogućuje ekspresiju virusnih proteina kao i sklapanje virusnih čestica koje oslobađanjem iz inficiranih stanica imaju mogućnost inficiranja drugih stanica. Nakon učinjene transfekcije dolazi do umnažanja plazmidne DNA. Nakon toga slijedi postupak infekcije stanica HEK-293, virusnim lizatom dobivenim nakon 48 sati inkubacije stanica HEK-293 inficiranim s 10 μ L, 20 μ L, 50 μ L i 100 μ L adenovirusa. Transfekcija stanica HEK 293 s adenovirusom u čijoj se okosnici nalazi divlji tip gena koji kodira gen za *TLR5* vrši se u 40 plastičnih posuda koje su dostigle 70-80% konfluentnosti. Postupak je ponovljen u drugih 40 plastičnih posuda sa stanicama HEK293, ali sada s adenovirusom u čijoj se okosnici nalazi gen koji kodira za *TLR5*^{N592S}.

Nakon 72 sata inkubacije pri 37°C 50% stanica je zalijepljeno, a 50% odljepljeno s vidljivim citopatološkim učinkom. Laganim lupkanjem boce, stanice se odvoje od podloge i njihov sadržaj skupljen. Sadržaj epruveta potom je centrifugiran, a talog stanica s virusnim česticama koristio se u svrhu pročišćavanja adenovirusnog vektora. Ultracentrifugiranje na jastučiću celzijevog klorida (Slika 19) i kasnije u gradijentu cezijeveog klorida (Slika 20) omogućilo je pročišćavanje adenovirusnog vektora iz dobivenog lizata u svrhu uklanjanja ostataka stanica kao i praznih virusnih kapsida.



Slika 18: Adenovirusna vrpca nakon prvog centrifugiranja



Slika 19: Adenovirusna vrpca nakon drugog centrifugiranja

U svrhu određivanja koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa mjerenjem apsorbancije pri 260 nm u razrjeđenju virusnog pripravka od 10x, odnosno 20x, dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 9.

Određivanje ukupnog broja virusnih čestica je važan podatak u kontroli kvalitete pročišćenih replikacijski nesposobnih adenovirusa. Ova spektrofotometrijska metoda se koristi samo za pročišćeni virus, a apsorbancija treba biti između 0,02 i 0,15.

Tablica 9: Ukupan broj virusnih čestica u volumenu od 1 mL dobiven mjerenjem apsorbancije pri 260 nm pri virusnim razrjeđenjima 10 x i 20 x.

Virus	A ₂₆₀	R	N
Ad5-TLR5 ^{wt}	0,091	10	1,00 x 10 ¹²
Ad5-TLR5 ^{wt}	0,073	20	1,606 x 10 ¹²
Ad5-TLR5 ^{N592S}	0,151	10	1,661 x 10 ¹²
Ad5-TLR5 ^{N592S}	0,075	20	1,650 x 10 ¹²

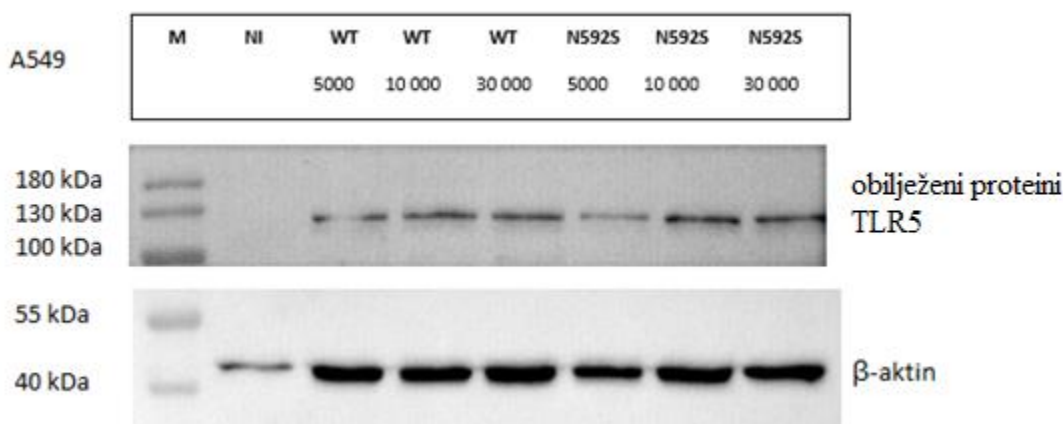
4.9. Unos gena *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} u humane stanice pluća

U svrhu infekcije stanične linije A549, WI38, H1299 inficirane su virusnim česticama tako što je u bunariće za svaku staničnu liniju dodano 5 000, 10 000 odnosno 30 000 virusnih čestica. Infekcija stanica u jednom slučaju provedena je konstruktom Ad5-*TLR5*^{wt}, a u drugom s konstruktom Ad5-*TLR5*^{N592S}.

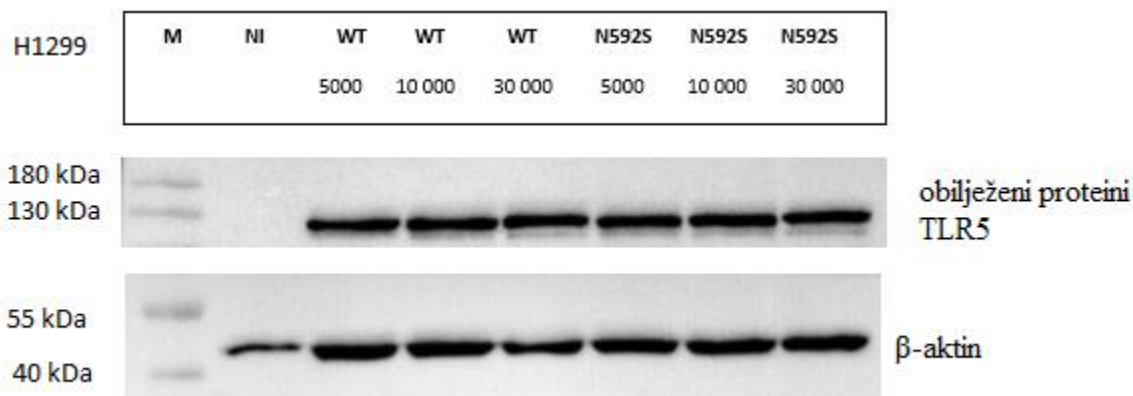
4.10. Western blot analiza ekspresije proteina TLR5

U svrhu dokazivanja uspješnosti infekcije staničnih linija A549, WI38, H1299 virusnim česticama provedena je metoda western blot.

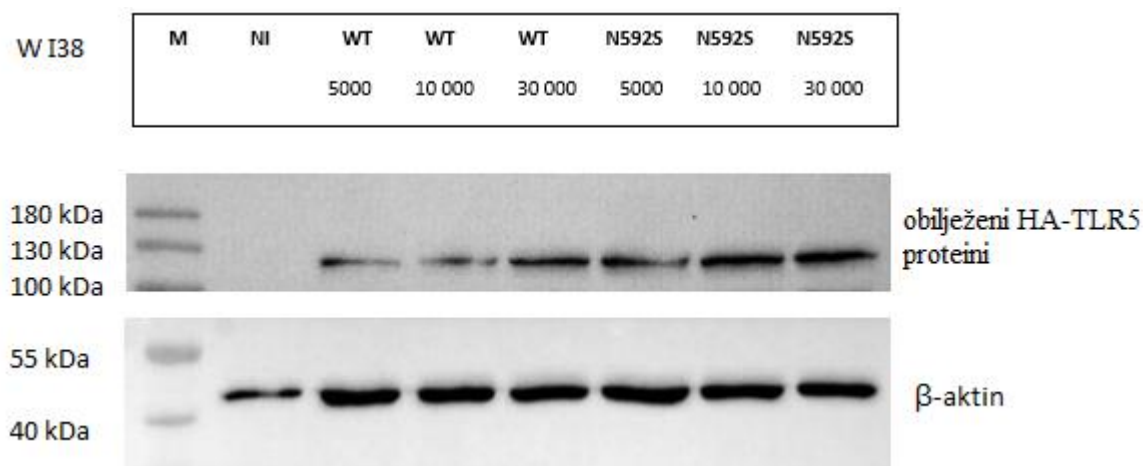
Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu provedena je za sedam uzoraka: neinficirani uzorak, uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{wt}, uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{wt}, uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{wt}, uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{N592S}, uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{N592S}, uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{N592S}. Potom se izvršila detekcija proteinskih vrpca (Slike 21, 22, 23).



Slika 20: Analiza ekspresije proteina TLR5 u staničnoj liniji A549, metodom Western blot pomoću sekundarnog anti-mišjeg imunoglobulina G antitijela s konjugiranom peroksidazom. Marker proteinskih masa (M), neinficirani uzorak (NI), uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{wt} (WT 5000), uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{wt} (WT 10 000), uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{wt} (WT 30 000), uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{N592S} (N592S 5000), uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{N592S} (N592S 10 000), uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-*TLR5*^{N592S} (N592S 30 000).



Slika 21: Analiza ekspresije proteina TLR5 u staničnoj liniji H1299, metodom Western blot pomoću sekundarnog anti-mišjeg imunoglobulina G antitijela s konjugiranom peroksidazom. Marker proteinskih masa (M), neinficirani uzorak (NI), uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt} (WT 5000), uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt} (WT 10 000), uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt} (WT 30 000), uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{N592S} (N592S 5000), uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{N592S} (N592S 10 000), uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{N592S} (N592S 30 000).



Slika 22: Analiza ekspresije proteina TLR5 u staničnoj liniji WI38, metodom Western blot pomoću sekundarnog anti-mišjeg imunoglobulina G antitijela s konjugiranom peroksidazom. Marker proteinskih masa (M), neinficirani uzorak (NI), uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt} (WT 5000), uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt} (WT 10 000), uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{wt} (WT 30 000), uzorak inficiran s 5 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{N592S} (N592S 5000), uzorak inficiran s 10 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{N592S} (N592S 10 000), uzorak inficiran s 30 000 virusnih čestica Ad5-TLR5^{N592S} (N592S 30 000).

TLR5 protein očekivano je detektiran u svim uzorcima, a proteinska vrpca TLR5 se pojavljuje na 130 kDa. Proteinska vrpca očekivano se ne pojavljuje u neinficiranom uzorcima. Kao kontrola korišten je β -aktin čija je ekspresija jednaka u svim eukariotskim stanicama. Proteinska vrpca kontrole pojavljuje se nešto iznad 40 kDa što potvrđuje sveprisutnost proteina u svim uzorcima.

5. RASPRAVA

KOPB je sustavni poremećaj kojeg karakterizira ireverzibilna opstrukcija dišnih puteva nastala kao posljedica kronične upale. Povezan je s izlaganjem duhanskom dimu, baš kao i rak pluća. Međutim, istraživanja su pokazala da je KOPB najveći čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća, neovisno o statusu pušenja. U svrhu održavanja homeostaze organizma važnu ulogu imaju regulacija imunskog odgovora kao i regulacija same upalne reakcije. Bitnu ulogu u pokretanju urođene imunosti imaju receptori TLR tako što prepoznaju patogenu pridružene slijedove i pokreću odgovarajuće signalne puteve u domaćinu kao antimikrobni odgovor (Aderem i Ulevitch, 2000, Akira i sur. 2001).

Dosadašnja istraživanja laboratorija u kojem je izrađen ovaj diplomski rad pokazala su da su određene mutacije unutar gena koji kodiraju za receptore TLR i molekula koje sudjeluju u prijenosu signala povezane s karcinomom pluća i KOPB-om i da ih je potrebno funkcionalno opisati. Još neobjavljeni rezultati ukazuju da su mutacije smještene u genu koji kodira za receptor TLR5 povezane s karcinomom pluća i opstrukcijom protoka zraka. Cilj ovog diplomskog rada bio je konstruirati replikacijski defektne adenovirusne vektore uvođenjem gena za $TLR5^{wt}$ i $TLR5^{N592S}$ u okosnicu adenovirusa tipa 5 koji bi zatim omogućio unos tog gena u modelni organizam, u ovom slučaju humane stanice pluća, A549, WI38, H1299.

Kloniranje gena je tehnika koja omogućuje amplifikaciju i prenošenje željenog gena iz jedne stanice u drugu, a uključuje umetanje fragmenata strane DNA u vektor koji se može autonomno replicirati u stanici domaćinu.

U ovom diplomskom radu, u svrhu dobivanja rekombinantne DNA molekule, slijed DNA koji kodira gen za receptor $TLR5^{wt}$ i $TLR5^{N592S}$ ligiran je u linearizirani vektor pShuttle-CMV.

U svrhu konstrukcije rekombinantnog Ad5-TLR5 virusa manipulacijom Ad5 genoma kao plazmida u bakteriji *Escherichia coli* homolognom rekombinacijom, koristio se bakterijski soj BJ5183. Rekombinacijska učinkovitost BJ5183 stanične linije povećava stabilnost izvangenomske DNA u bakterijama jer su neke nukleaze inaktivirane što omogućuje dulje zadržavanje DNA u stanicama, a zatim i povećanje učinkovitosti homologne rekombinacije. Stanična linija BJ5183 s ugrađenim genomom Ad-5 koji sadrži slijedove komplementarne slijedovima vektora pShuttle-CMV s ugrađenim genom koji kodira za receptor TLR5 transformirana je postupkom elektroporacije. Smatra se kako uporaba elektroporacije i velike količine DNA povećava

uspješnost transformacije bakterija što rezultira i zasićenjem nukleaza što povećava vjerojatnost homologne rekombinacije.

U svrhu prijenosa genetskog materijala konstruiran je adenovirusni vektor koji je morao zadovoljiti uvjet visoke učinkovitosti prijenosa gena i kontroliranu ekspresiju gena koji kodira za divlji tip receptora TLR5, kao i genetičke varijante receptora TLR5, N592S.

Adenovirusni vektori jedni su od prvih vektorskih sustava ikada razvijenih (Campos i Barry 2007). Zaražavanjem ciljnih stanica adenovirusnim vektorima, adenovirusi omogućuju prolaznu ekspresiju ugrađenog gena u ciljnim stanicama (Nielsen i Maneval 1998).

U ovom diplomskom radu umnoženi su adenovirusni vektori Ad5-TLR5^{wt} i Ad5-TLR5^{N592S} u staničnoj liniji HEK-293 te potom pročišćeni ultracentrifugiranjem u gradijentu cezijeveg klorida. Metoda pročišćavanja virusnih čestica u gradijentu gustoće cezijeveg klorida najčešće je korištena metoda, a danas se u tu svrhu koristi i metoda afinitetne kromatografije kojom se pročišćavaju proteini, a primjena takve metode omogućuje još viši stupanj čistoće (Wu i Ataai 2000).

Prema gore navedenim podacima uspješno je provedeno kloniranje gena za *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} u vektor pShuttle-CMV kao i konstrukcija replikacijski defektnog adenovirusnog vektora uvođenjem gena za *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} u okosnicu adenovirusa tipa 5. Uspješnost eksperimenta također potvrđuje i unos gena za *TLR5*^{wt} i *TLR5*^{N592S} u humane stanice pluća, A549, WI38, H1299 koji je potvrđen western analizom.

Značaj ovih rezultata je u tome što će omogućiti daljnje funkcionalne analize varijanti gena za koje je pokazano da su povezane s osjetljivošću na razvoj KOPB-a i karcinoma pluća. Prije svega, omogućit će se olakšani unos strane DNA u stanične modelne sustave i na taj način omogućiti testiranje efikasnosti prijenosa signala putem stimulacije divljeg i mutiranog tipa receptora TLR5. Nadalje, proizvedeni adenovirusni konstrukti biti će neophodni i za unos DNA u humane monocitne stanice THP-1, dobivene iz pacijenata s akutnom mijeloičnom leukemijom, za potrebe ispitivanja utjecaja prisutnosti mutacije na ekspresiju kostimulirajućih molekula na površini stanice.

Za zaključiti je da na širok spektar korištenja adenovirusnih vektora ukazuju brojna istraživanja u kojima su isti konstruirani i korišteni u svrhu zaražavanja ciljnih stanica.

Tako su svojim istraživanjem Chartier i sur. (1996) pokazali da se rekombinantni adenovirusni genomi modificirani u obje regije E1 i E3 mogu učinkovito generirati i da je njihova izolacija u obliku čistih virusnih čestica zajamčena u transfektiranim 293 stanicama. Ekspresiju proteina dokazali su postupkom radioimunoprecitacije za prethodno transfecirane stanične linije 293 i A549.

Nadalje, istraživanja koja su proveli Järås i sur. (2007) usmjerila su se na napredak i potencijalne buduće aplikacije prijenosa adenovirusnih čestica u ljudske primitive hematopoetske stanice i stanice leukemije. Njihovim istraživanjem opisana je konstrukcija adenovirusnog vektora metodom pAdEasy koja je korištena i detaljno opisana i u ovome diplomskome radu.

Konačno, Neering i sur. (1996) u svojem su radu ispitali sposobnost rekombinantnih adenovirusnih vektora za transdukciju ljudskih hematopoetskih stanica. Adenovirusni konstrukti umnoženi su u stanicama 293 te potom pročišćeni u gradijentu cezijeveog klorida. Svojim istraživanjem zaključili su između ostaloga i da su rekombinantni adenovirusi učinkovito sredstvo za prolazno eksprimiranje gena u primitivnim humanim hematopoetskim stanicama.

6. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu uspješno su konstruirana dva adenovirusna vektora uvođenjem gena za *TLR5^{wt}* i *TLR5^{N592S}* u okosnicu adenovirusa tipa 5. Nadalje, adenovirusni konstrukti poslužili su za infekciju humanih stanica pluća, preciznije staničnih linija A549, WI38, H1299. U svrhu dokazivanja funkcionalnosti izrađenih adenovirusnih konstrukata, tj. uspješnosti infekcije provedena je metoda western blot kojom se uspješno dokazala ekspresija TLR5 u humanim stanicama pluća što je dokaz kako se adenovirusni konstrukti mogu koristiti kao vektori za unos gena u stanične linije koje je teško transfecirati. Također, izrađeni adenovirusni konstrukti omogućit će daljnja ispitivanja funkcionalnosti prijenosa signala putem receptora TLR5, kao i ispitivanja interakcije proteina TLR5 s drugim signalnim molekulama nakon aktivacije specifičnim ligandom.

7. LITERATURA

Aderem, A., Ulevitch, R. (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787.

Aderem, A., Underhill, D. (1999): Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annual Review of Immunology* **17**: 593-623.

Afkhami, S., Yao, Y., Xing, Z. (2016): Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* **3**: 1-10.

Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* **2**: 675-680.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**: 783-801.

Alexopoulou, L., Holt, A., Medzhitov, R., Flavell, R. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732-738.

Anderson, K., Bokla, L., Nüsslein-Volhard, C. (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**: 791-798.

Arbour, N., Lorenz, E., Schutte, B., Zabner, J., Kline, J., Jones, M., Frees, K., Watt, J., Schwartz, D. (2000): TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics* **25**: 187-191.

Arcavi, L., Benowitz, N. (2004): Cigarette Smoking and Infection. *Archives of Internal Medicine* **164**: 2206-2216.

Bai, M., Harfe, B., Freimuth, P. (1993): Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *Journal of virology* **67**: 5198-5205.

- Bardoel, B., Van Der Ent, S., Pel, M., Tommassen, J., Pieterse, C., van Kessel, K., van Strijp, J. (2011): Pseudomonas Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. *PLoS Pathogens* **7**: 1-11.
- Bauer, U., Flunker, G., Bruss, K., Kallwellis, K., Liebermann, H., Luettich, T., Motz, M., Seidel, W. (2005): Detection of Antibodies against Adenovirus Protein IX, Fiber, and Hexon in Human Sera by Immunoblot Assay. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4426-4433.
- Bergelson, J., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M. S., Wickham, T., Crowell, R., Finberg, R. (1998): The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *Journal of virology* **72**: 415-419.
- Bermudez, E., Rifai, N., Buring, J., Manson, J., Ridker, P. (2002): Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *The American Journal of Cardiology* **89**: 1117-1119.
- Bett, A., Prevec, L., Graham, F. (1993): Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *Journal of virology* **67**: 5911-5921.
- Campos, S., Barry, M. (2007): Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting. *Current gene therapy* **7**: 189-204.
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., Mehtali, M. (1996): Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Journal of virology* **70**: 4805-4810.
- Chaurasiya, S., Hitt, M., (2016): Adenoviral Vector Construction I: Mammalian Systems. In *Adenoviral Vectors for Gene Therapy (Second Edition)* str. 85-112.
- Chen, K., Huang, J., Gong, W., Iribarren, P., Dunlop, N., Wang, J. (2007): Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *International Immunopharmacology* **7**: 1271-1285.
- Churg, A., Zhou, S., Wang, X., Wang, R., Wright, J. (2009): The Role of Interleukin-1 β in Murine Cigarette Smoke-Induced Emphysema and Small Airway Remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **40**: 482-490.
- Cook, D., Pisetsky, D., Schwartz, D. (2004): Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology* **5**: 975-979.

- Danthinne, X., Imperiale, M. (2000): Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy* **7**: 1707-1714.
- Dekleijn, D., Pasterkamp, G. (2003): Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* **60**: 58-67.
- Douglas, J. (2007): Adenoviral vectors for gene therapy. *Molecular biotechnology* **36**: 71-80.
- Durham, A., Adcock, I. (2015): The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer* **90**: 121-127.
- Enders, J., Bell, J., Dingle, J., Francis, T., Hilleman, M., Huebner, R., Payne, A. (1956): "Adenoviruses": Group Name Proposed for New Respiratory-Tract Viruses. *Science* **124**: 119-120.
- Garibyan, L., Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, **133**: 1-8.
- Gewirtz, A., Navas, T., Lyons, S., Godowski, P., Madara, J. (2001): Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *The Journal of Immunology* **167**: 1882-1885.
- Ghosh-Choudhury, G., Haj-Ahmad, Y., Graham, F. (1987): Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. *The EMBO Journal* **6**: 1733-1739.
- Glossop, J., Dawes, P., Matthey, D. (2006): Association between cigarette smoking and release of tumour necrosis factor and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **45**: 1223-1229.
- Greber, U., Willetts, M., Webster, P., Helenius, A. (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**: 477-486.
- Gupta, S., Bajwa, P., Deb, R., Chellappa, M., Dey, S. (2014): Flagellin A Toll-Like Receptor 5 Agonist as an Adjuvant in Chicken Vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology* **21**: 261-270.

Halbert, D., Cutt, J., Shenk, T. (1985): Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *Journal of virology* **56**: 250-257.

Hayashi, F., Smith, K., Ozinsky, A., Hawn, T., Eugene, C., Goodlett, D., Eng, J., Akira, S., Underhill, D., Aderem, A. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.

He, T., Zhou, S., da Costa, L., Yu, J., Kinzler, K., Vogelstein, B. (1998): A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 2509-2514.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004): Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* **303**: 1526-1529.

Hersey, P., Prendergast, D., Edwards, A. (1983): Effects of cigarette smoking on the immune system. Follow-up studies in normal subjects after cessation of smoking. *The Medical Journal of Australia* **2**: 425-429.

Hoffmann, J., Kafatos, F., Janeway, C., Ezekowitz, R. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **284**: 1313-1318.

Houghton, A. (2013): Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nature Reviews Cancer* **13**: 233-245.

Howitt, J., Anderson, C. W., Freimuth, P. (2003): Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. In *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions*. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 331-364.

<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl20.html> (pristupljeno 22.08.2018.)

<https://nptel.ac.in/courses/102103041/module2/lec13/1.html> (pristupljeno 20.08.2018.)

<https://www.creative-diagnostics.com/tag-adenovirus-antigens-1.htm> (18.08.2018.)

Järås, M., Brun, A., Karlsson, S., Fan, X. (2007): Adenoviral vectors for transient gene expression in human primitive hematopoietic cells: applications and prospects. *Experimental hematology* **35**: 343-349.

- Kawai, T., Akira, S. (2007): Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine* **13**: 460-469.
- Kawai, T., Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**: 373-384.
- Kawai, T., Akira, S. (2011): Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**: 637-650.
- Kelly, T.J. (1984): Adenovirus DNA Replication. In: Ginsberg H.S. (eds) *The Adenoviruses. The Viruses*. Springer, Boston, MA, str. 271-308.
- Khare, R., Y. Chen, C., A. Weaver, E., Barry, M. (2011): Advances and Future Challenges in Adenoviral Vector Pharmacology and Targeting. *Current Gene Therapy* **11**: 241-258.
- Kim, J. (2006): Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metabolism* **4**: 417-419.
- Kim, V., Criner, G. (2013): Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **187**: 228-237.
- Klimosch, S., Försti, A., Eckert, J., Knežević, J., Bevier, M., von Schönfels, W., Heits, N., Walter, J., Hinz, S., Lascorz, J., Hampe, J., Hartl, D., Frick, J., Hemminki, K., Schafmayer, C., Weber, A. (2013): Functional TLR5 Genetic Variants Affect Human Colorectal Cancer Survival. *Cancer Research* **73**: 7232-7242.
- Malenica, B. (2005): Nespecifična i specifična imunost. *Pediatr Croat* **49**: 23-30.
- McInturff, J., Modlin, R., Kim, J. (2005): The Role of Toll-like Receptors in the Pathogenesis and Treatment of Dermatological Disease. *Journal of Investigative Dermatology* **125**: 1-8.
- Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **1**: 135-145.
- Merx, S., Zimmer, W., Neumaier, M., Ahmad-Nejad, P. (2006): Characterization and functional investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TLR5 gene. *Human Mutation* **27**: 293-293.

- Miller, L., Goldstein, G., Murphy, M., Ginns, L. (1982): Reversible Alterations in Immunoregulatory T Cells in Smoking. *Chest* **82**: 526-529.
- Neering, S., Hardy, S., Minamoto, D., Spratt, S., Jordan, C. (1996): Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors. *Blood* **88**: 1147-1155.
- Nemerow, G. (2000): Cell Receptors Involved in Adenovirus Entry. *Virology* **274**: 1-4.
- Nielsen, L., Maneval, D. (1998): P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer gene therapy* **5**: 52-63.
- O'Neill, L. (2006): How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology* **18**: 3-9.
- O'Neill, L., Bryant, C., Doyle, S. (2009): Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer. *Pharmacological Reviews* **61**: 177-197.
- Ostapchuk, P., Hearing, P. (2003): Minimal cis-Acting Elements Required for Adenovirus Genome Packaging. *Journal of Virology* **77**: 5127-5135.
- Pandey, R., Yu, F., Kumar, A. (2013): Targeting toll-like receptor signaling as a novel approach to prevent ocular infectious diseases. *The Indian journal of medical research* **138**: 609-619.
- Papi, A., Casoni, G., Caramori, G., Guzzinati, I., Boschetto, P., Ravenna, F., Calia, N., Petruzzelli, S., Corbetta, L., Cavallese, G., Forini, E., Saetta, M., Ciaccia, L., Fabri, M. (2004): COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax* **59**: 679-681.
- Pastan, I., Seth, P., FitzGerald, D., Willingham, M. (1986): Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. In *Concepts in viral pathogenesis II*. Springer, New York, NY, str. 141-146.
- Pauwels, R., Buist, A., Calverley, P., Jenkins, C., Hurd, S. (2001): Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **163**: 1256-1276.

Rekosh, D., Russell, W., Bellet, A., Robinson, A. (1977): Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* **11**: 283-295.

Rowe, W., Huebner, R., Gilmore, L., Parrott, R., Ward, T. (1953): Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Experimental Biology and Medicine* **84**: 570-573.

Salvi, S., Barnes, P. (2009): Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet* **374**:733-743.

Shaw, A., Ziff, E. (1980): Transcripts from the adenovirus-2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families. *Cell* **22**: 905-916.

Shuang, C., Weiguang, Y., Zhenkun, F., Yike, H., Jiankun, Y., Jing, X., Xinghan, L., Yue, L., Dalin, L. (2017): Toll-like receptor 5 gene polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *Oncotarget* **8**: 88622-88629.

Song, W., Jeon, Y., Namgung, B., Hong, M., Yoon, S. (2017): A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin. *Scientific Reports* **7**:1-11.

Stewart, P., Burnett, R., Cyrklaff, M., Fuller, S. (1991): Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* **67**: 145-154.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999): Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* **11**: 443-451.

Thomas, G., Mathews, M. (1980): DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. *Cell* **22**: 523-533.

Thun, M., Henley, S., Burns, D., Jemal, A., Shanks, T., Calle, E. (2006): Lung Cancer Death Rates in Lifelong Nonsmokers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **98**: 691-699.

Trejo-de la O, A., Hernández-Sancén, P., Maldonado-Bernal, C. (2014): Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes and Immunity* **15**: 199-209.

Turner, M., Chen, Y., Krewski, D., Calle, E., Thun, M. (2007): Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with Lung Cancer Mortality in a Prospective Study of Never Smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **176**: 285-290.

Villeneuve, P., Mao, Y. (1994): Lifetime probability of developing lung cancer, by smoking status, Canada. *Canadian journal of public health= Revue canadienne de sante publique* **85**: 385-388.

Wagner, E., Zatloukal, K., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Curiel, D., Birnstiel, M. (1992): Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 6099-6103.

Wickham, T., Mathias, P., Cheresch, D., Nemerow, G. (1993): Integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**: 309-319.

Wu, N., Ataai, M. (2000): Production of viral vectors for gene therapy applications. *Current Opinion in Biotechnology* **11**: 205-208.

WY Ip, W., Qasim, W. (2013): Management of Adenovirus in Children after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Advances in Hematology* str. 1-12.

Yu, L., Chen, S. (2008): Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **57**: 1271-1278.

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

8. Životopis

Rođena sam 8. kolovoza 1994. godine u Bjelovaru. Od 2001. do 2009. godine pohađala sam osnovnu školu Velika Pisanica. Od 2009. do 2013. godine pohađala sam Gimnaziju Bjelovar, opći smjer. Nakon srednje škole, iste godine upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu i 2013. godine stekla akademsku titulu prvostupnice biologije i kemije. Godine 2016. upisala sam studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Diplomski rad započela sam u studenome 2017. godine u Laboratoriju za naprednu genomiku, na Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu.