

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Davor Nestić

**KARAKTERIZACIJA ULASKA ADENOVIRUSA TIP 26 U
STANICE EPITELA ČOVJEKA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

KARAKTERIZACIJA ULASKA ADENOVIRUSA TIP 26 U STANICE EPITELA ČOVJEKA

Davor Nestić

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

Mentor: dr. sc. Dragomira Majhen, viša znanstvena suradnica IRB

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Vektori temeljeni na adenovirusu čovjeka tipa 26 (HAdV26) su kandidati s velikim potencijalom za razvoj vektorskih vakcina te primjenu u genskoj terapiji. Dosad je *in vivo* istražen imunosni odgovor organizma na infekciju s HAdV26, dok nedostaju podaci o mehanizmima uključenim u ulazak i unutarstanično putovanje HAdV26. U ovom je radu, molekularno biološkim metodama, otkriven $\alpha\beta 3$ integrin kao receptor za HAdV26 infekciju epitelnih stanica čovjeka. Osim toga pokazana je važna uloga dinamina-2, klatrina i caveolina-1 u ulasku HAdV26 u stanice čovjeka. Konačno, pokazan je različit profil poticanja urođenog imunosnog odgovora *in vitro* između HAdV26 i drugih tipova adenovirusa čovjeka. Rezultati ovog istraživanja će povećati temeljno znanje o HAdV26 te omogućiti razvoj uspješnijih vektora u svrhu genske terapije i vakcinacije.

Broj stranica: 155

Broj slika: 46

Broj tablica: 20

Broj literaturnih navoda: 222

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: adenovirus čovjeka tipa 26, $\alpha\beta 3$ integrin, endocitoza, imunosni odgovor

Datum obrane: 30.12.2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica IRB, predsjednica povjerenstva
2. prof. dr. sc. Hrvoje Lepeduš, redoviti profesor u trajnom zvanju Filozofskog fakulteta Osijek i Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, član
3. prof. dr. sc. Igor Weber, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju IRB, član
4. dr. sc. Sandra Sobočanec, viša znanstvena suradnica IRB, zamjena člana
5. dr. sc. Juraj Simunić, znanstveni suradnik IRB, zamjena člana

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

ADENOVIRUS TYPE 26 CELL ENTRY INTO HUMAN EPITHELIAL CELLS

Davor Nestić

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

Supervisor: Dragomira Majhen, PhD, Senior research associate RBI

Short abstract:

Human adenovirus type 26 (HAdV26) based vectors are candidates with great potential for the development of vector vaccines and applications in gene therapy. So far, the immune response to HAdV26 infection has been investigated *in vivo*, while data on the mechanisms involved in HAdV26 entry and intracellular trafficking are lacking. In this dissertation, $\alpha\beta 3$ integrin was discovered by molecular biology techniques as a receptor for HAdV26 infection of human epithelial cells. In addition, the important role of dynamin-2, clathrin, and caveolin-1 in the entry of HAdV26 into human cells was shown. Finally, a different profile of the innate immune response *in vitro* between HAdV26 and other types of human adenovirus was shown. The results obtained within this study will increase the basic knowledge about HAdV26 and enable the development of more successful vectors for gene therapy and vaccination purposes.

Number of pages: 155

Number of figures: 46

Number of tables: 20

Number of references: 222

Original in: croatian

Key words: adenovirus type 26, $\alpha\beta 3$ integrin, endocytosis, immune response

Date of the thesis defense: 30.12.2020.

Reviewers:

1. Andreja Ambriović Ristov, PhD, Associate Professor, Senior Scientist RBI, president of commission
2. Hrvoje Lepeduš, PhD, Full Professor with tenure, Faculty of Humanities and Social Sciences and Faculty of Dental Medicine and Health, J.J. Strossmayer University of Osijek, member
3. Igor Weber, PhD, Full Professor, Senior Scientist tenure RBI, member
4. Sandra Sobočanec, PhD, Senior research associate RBI, substitute member
5. Juraj Simunić, PhD, Research associate RBI, substitute member

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

Ova doktorska disertacija je izrađena u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Dragomire Majhen, više znanstvene suradnice, u okviru uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razumijevanje puta ulaska Adenovirusa tipa 26 u stanicu: način poboljšanja vektora za vakcinaciju“ (HRZZ-UIP-2014-09-3912) i istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Endocitoza adenovirusa i urođeni imunosni odgovor“ (HRZZ-IP-2019-04-6048).

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Dragomiri Majhen na pruženoj prilici i povjerenju, na puno truda koji je uloženi u mene i ovaj rad, na svim savjetima, brizi, velikom strpljenju, razvijanju kritičkog razmišljanja, užitima u kasna popodneva, znanstvenim i malo manje znanstvenim raspravama, dokazu da mentor može biti i prijatelj, i maćuhicama koje su dobile potpuni smisao.

Hvala Kseniji što je uskakala, poticala, tješila i činila dane vrckavima s neponovljivim izjavama (svakako se ističe ona prva). Hvala Isabeli što je osnažila naš AdenoTeam.

Hvala svim bivšim i sadašnjim kolegama i prijateljima iz Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, nema dana kada mi je bilo mrsko doći za središnji stol labosa uvijek ispunjenog kojekakvim dobrotama, što uključuje i vaš osmijeh, ali i mnoštvo zabavnih i znanstvenih rasprava koje su mi dale nemjerljivo znanje i široke vidike.

Hvala i svim drugim kolegama i prijateljima na pomoći, znanju, podršci i aktivnostima nakon posla koji su doprinijeli ovoj doktorskoj disertaciji.

Hvala mojim roditeljima, Nadi i Alojzu, na nesebičnoj podršci, ljubavi i brizi koje su olakšale moj životni put.

Veliko hvala Marti i Anti, na najvećoj mogućoj podršci i u ono vrijeme kada moje društvo nije bilo obasuto ljubavima. Kako je vaše znanje o virusima bitno povećano, tako je povećana i moja zahvalnost prema vama. Uvijek ste me poticali, tješili i vjerovali da će cilj biti postignut, stoga je ovo i vaš rad.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Adenovirusi čovjeka..... | 1 |
| 1.2. Struktura adenovirusa čovjeka | 2 |
| 1.3. Životni ciklus adenovirusa | 4 |
| 1.3.1. Vežanje adenovirusa na površinu stanica..... | 5 |
| 1.3.2. Ulazak adenovirusa endocitozom | 7 |
| 1.3.3. Unutarstanično putovanje adenovirusa | 9 |
| 1.3.4. Unos genoma adenovirusa u jezgru | 10 |
| 1.3.5. Transkripcija i replikacija adenovirusa te sklapanje adenoviralnih čestica i njihov izlazak iz stanice..... | 11 |
| 1.4. Odgovor imunskog sustava na infekciju s adenovirusima..... | 12 |
| 1.5. Viralni vektori..... | 15 |
| 1.5.1. Konstrukcija adenoviralnih vektora | 15 |
| 1.5.2. Upotreba adenoviralnih vektora | 17 |
| 1.6. Adenovirus čovjeka serotipa 26..... | 19 |
| 1.7. Endocitoza..... | 21 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 26 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 27 |
| 3.1. Materijali | 27 |
| 3.1.1. Osnovne kemikalije..... | 27 |
| 3.1.2. Pufferi i otopine | 28 |
| 3.1.3. Stanične linije..... | 29 |
| 3.1.4. Replikacijski defektni adenovirusni vektori | 29 |
| 3.1.5. Kompleti kemikalija i standardi..... | 29 |
| 3.1.6. Protutijela | 30 |
| 3.1.7. Kemijski inhibitori endocitoze..... | 31 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1.8. | Početnice | 31 |
| 3.1.9. | Male interferirajuće RNA (siRNA) | 32 |
| 3.1.10. | Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali..... | 32 |
| 3.1.11. | Računalni programi..... | 33 |
| 3.2. | METODE | 34 |
| 3.2.1. | Uzgoj staničnih linija | 34 |
| 3.2.2. | Umnažanje i pročišćavanje adenoviralnih vektora centrifugiranjem u cezijeve kloridu | 35 |
| 3.2.3. | Obilježavanje adenovirusa fluorescentnom bojom..... | 36 |
| 3.2.4. | Određivanje koncentracije adenovirusa u suspenziji pročišćenih adenovirusa | 36 |
| 3.2.5. | Određivanje uspješnosti transdukcije adenoviralnim vektorima..... | 37 |
| 3.2.6. | Određivanje vezanja i internalizacije adenovirusa | 38 |
| 3.2.7. | Određivanje ekspresije receptora na površini stanica protočnom citometrijom..... | 38 |
| 3.2.8. | Utišavanje gena transfekcijom malih interferirajućih RNA molekula | 39 |
| 3.2.9. | Izdvajanje klonova A549 stanične linije s povećanom ili smanjenom ekspresijom proteina od interesa | 39 |
| 3.2.10. | Unutarstanično putovanje fluorescentno obilježenih adenovirusa | 41 |
| 3.2.11. | Unutarstanično putovanje HAdV26 i kolokalizacija s $\alpha\beta 3$ integrinom, EEA1, LAMP1 ili Golgijevim tijelom | 43 |
| 3.2.12. | Istraživanje imunskog odgovora stanica na infekciju s adenovirusima.. | 44 |
| 3.2.13. | Određivanje količine izlučenih citokina i kemokina nakon infekcije adenovirusima | 45 |
| 3.2.14. | Određivanje ekspresije citokina i kemokina koji su potaknuti infekcijom s adenovirusima | 46 |
| 3.2.15. | Određivanje ekspresije gena uključenih u inflammasom nakon infekcije stanica s HAdV26 | 47 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.16. | Analiza ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot | 47 |
| 3.2.17. | Korištenje kemijskih inhibitora endocitoze | 49 |
| 3.2.18. | Statistička obrada podataka | 50 |
| 4. | REZULTATI | 51 |
| 4.1. | Uspješnost transdukcije epitelnih stanica čovjeka s HAdV26 ovisi o količini α v integrina na površini stanica..... | 51 |
| 4.2. | α v β 3 integrin neophodan je za uspješnu infekciju s HAdV26 | 53 |
| 4.3. | HAdV26 povećano ulazi u stanice s povećanom ekspresijom α v β 3 integrina i kolokalizira s α v β 3 integrinom..... | 60 |
| 4.4. | Usporedba unutarstaničnog putovanja HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 staničnoj liniji..... | 62 |
| 4.5. | Uloga dinamina-2, klatrina i kaveolina-1 u uspješnosti transdukcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 i A549-E6 stanicama | 66 |
| 4.5.1. | Utišavanje dinamina-2 smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 i A549-E6 stanicama te smanjuje broj uspješno internaliziranih HAdV5 i HAdV26 u A549 stanicama..... | 71 |
| 4.5.2. | Utišavanje klatrina značajno povećava uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u A549 staničnoj liniji uslijed povećane ekspresije α v β 3 integrina | 73 |
| 4.5.3. | Utišavanje kaveolina-1 ne mijenja značajno uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u A549 staničnoj liniji unatoč povećanoj ekspresiji α v β 3 integrina, ali smanjuje uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u klonu A549-E6 | 80 |
| 4.5.4. | Utišavanje kaveolina-1 u klonu 69 sa stabilno utišanim klatrinom smanjuje povećanu uspješnost transdukcije s HAdV26 | 87 |
| 4.6. | Inhibicija klatrinom posredovane endocitoze korištenjem inhibitora pitstop 2 u A549 i A549-E6 staničnim linijama utječe na povećanje infekcije s HAdV26 . | 88 |
| 4.7. | Tijekom unutarstaničnog putovanja HAdV26 u A549 stanicama udio viralnih čestica koje kolokaliziraju s LAMP1 raste s povećanjem vremena inkubacije | 94 |

| | |
|---|------------|
| 4.8. Ulazak HAdV26 u A549 i SK-OV-3 stanične linije potiče ekspresiju gena uključenih u urođeni imunosni odgovor, pri čemu je ta ekspresija jača od one potaknute ulaskom HAdV5, ali slabija od HAdV35..... | 97 |
| 5. RASPRAVA | 103 |
| 6. ZAKLJUČCI | 121 |
| 7. LITERATURA | 123 |
| 8. SAŽETAK | 147 |
| 9. SUMMARY | 149 |
| 10. PRILOZI | 151 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 153 |

POPIS KRATICA

| | | |
|----------------------|---|---|
| CAR | coxsackie i adenoviralni receptor | engl. <i>Coxsackie and Adenovirus Receptor</i> |
| CAV-1 | kaveolin-1 | engl. <i>caveolin-1</i> |
| CLR | lektinski receptori tipa C | engl. <i>C-type lectin receptors</i> |
| CLTC | klatrin | engl. <i>clathrin</i> |
| CsCl | cezijev klorid | engl. <i>caesium chloride</i> |
| DMSO | dimetilsulfoksid | engl. <i>dimethyl sulfoxide</i> |
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina | engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| DNM2 | dinamin-2 | engl. <i>dynamin-2</i> |
| EE | rani endosomi | engl. <i>early endosomes</i> |
| EEA1 | rani endosomalni antigen 1 | engl. <i>Early Endosomal Antigen 1</i> |
| ELISA | enzimski imunotest na čvrstoj fazi | engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ERK | kinaza regulirana izvanstaničnim signalima | engl. <i>Extracellular Receptor Kinase</i> |
| GAPDH | gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> |
| GFP | zeleni fluorescentni protein | engl. <i>green fluorescent protein</i> |
| h | sat | engl. <i>hour</i> |
| HAdV | adenovirusi koji inficiraju čovjeka | engl. <i>human adenovirus</i> |
| HIV | virus imunodeficijencije čovjeka | engl. <i>Human Immunodeficiency Virus</i> |
| HPV | papiloma virus čovjeka | engl. <i>Human Papillomavirus</i> |
| HVR | hipervarijabilne petlje | engl. <i>hypervariable region</i> |
| IFN | interferon | engl. <i>interferon</i> |
| IL | interleukin | engl. <i>interleukin</i> |
| ITR | obrnuto ponavljajući sljedovi | engl. <i>inverted terminal repeats</i> |
| K_D | konstanta disocijacije | engl. <i>dissociation constant</i> |
| LAMP1 | membranski protein 1 povezan s lizosomom | engl. <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i> |
| LE | kasni endosomi | engl. <i>late endosomes</i> |
| MAPK | mitogen-aktivirane protein kinaze | engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> |
| ME | sazrijevajući endosomi | engl. <i>maturing endosomes</i> |
| MFI | srednja vrijednost intenziteta fluorescencije | engl. <i>mean fluorescence intensity</i> |
| min | minuta | engl. <i>minute</i> |
| MLP | glavni kasni promotor | engl. <i>major late promoter</i> |
| MOI | broj dodanih viralnih čestica po stanici | engl. <i>multiplicity of infection</i> |
| MTOC | središte organizacije mikrotubula | engl. <i>microtubule organizing center</i> |
| NK stanice | prirodne stanice ubojice | engl. <i>natural killer cells</i> |
| NLR | NOD-slični receptori | engl. <i>NOD-like receptors</i> |

| | | |
|-----------------|--|--|
| NPC | kompleks jezgrine pore | engl. <i>nuclear pore complex</i> |
| ns | nema statističkog značaja | engl. <i>non-significant</i> |
| PAMP | patogenom povezani molekularni uzorci | engl. <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> |
| PRR | receptori za prepoznavanje uzoraka | engl. <i>Pattern Recognition Receptors</i> |
| RCA | regulatori aktivacije komplementa | engl. <i>Regulators of Complement Activation</i> |
| RE | reciklirajući endosomi | engl. <i>recycling endosomes</i> |
| RGD | slijed arginin-glicin-aspartat | engl. <i>motif Arginine-Glycine-Aspartate</i> |
| RLR | receptori slični genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina | engl. <i>retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors</i> |
| SDS | natrij-dodecil sulfat | engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SDS-PAGE | denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pomoću natrij-dodecil sulfata | engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| siRNA | male interferirajuće RNA | engl. <i>small interfering RNA</i> |
| TLR | Toll-slični receptori | engl. <i>Toll-like receptors</i> |
| UXP | U egzon protein | engl. <i>U exon protein</i> |

1. UVOD

1. UVOD

Adenovirusi su virusi bez ovojnice čiji genetički materijal čini DNA smještena unutar proteinske kapside. Životni ciklus adenovirusa u potpunosti se oslanja na procese u stanici domaćina koji omogućuju njihovo umnažanje i širenje. Stoga su adenovirusi unutarstanični paraziti koji sa stanicama koje inficiraju uspostavljaju dinamičke interakcije čije opisivanje će pomoći u razumijevanju same biologije adenovirusa, ali i u dizajnu novih terapijskih pristupa.

1.1. Adenovirusi čovjeka

Adenovirusi pripadaju porodici virusa *Adenoviridae* koja je podijeljena u pet rodova: *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus* i *Ichtadenovirus* prema domaćinu koji pojedina vrsta inficira te po slijedu nukleotida u DNA. Adenovirusi koji inficiraju čovjeka (engl. *human adenovirus*, HAdV) klasificirani su unutar roda *Mastadenovirus* zajedno s nekoliko adenovirusa viših primata, a prvi put su izolirani sredinom 20. stoljeća prilikom pokušaja uzgoja adenoidnog tkiva u laboratoriju i izolacijom iz sekreta gornjeg dijela dišnog sustava (Rowe i sur., 1953; Hilleman i sur., 1954). Broj poznatih serotipova HAdV se neprestano povećava uslijed napretka novih metoda sekvenciranja koje omogućuju sveobuhvatnu analizu cijelog genoma novih izolata. Do sada je karakterizirano 67 serotipa HAdV i oni su razvrstani u 7 podgrupa A-G (Lefkowitz i sur., 2018) prema hemaglutinaciji i reakcijama neutralizacije seruma ili pomoću sekvenciranja genoma i bioinformatičke analize (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) (Tablica 1). Najistraženiji su HAdV serotipa 5 i 2 (HAdV5, HAdV2) iz podgrupe C.

Infekcije s HAdV javljaju se tijekom cijele godine bez značajnih sezonskih varijacija kao sporadične infekcije, ali su opisane i lokalne epidemije (Lewis i sur., 2009; Centers for Disease, C. and Prevention, 2007). Prenose se udisanjem aerosolnih kapljica, direktnom inokulacijom u spojnicu oka, fekalno-oralnim širenjem ili izlaganjem putem zaraženog tkiva ili krvi (Ruuskanen i sur., 2002). U laboratorijskim uvjetima je utvrđeno da adenovirusi mogu uzrokovati tumore u glodavcima (Trentin i sur., 1962; Yabe i sur., 1962) dok isto nije pokazano za ljude te se HAdV ne smatraju onkogenim virusima (Hendrickx i sur., 2014). U odraslih osoba infekcije su uglavnom asimptomatske ili s

tek blažim do umjerenim simptomima, ali kod novorođenčadi, male djece i imunokompromitiranih osoba mogu uzrokovati težu kliničku sliku pa i smrt (Echavarria, 2008).

Tablica 1. Podjela HAdV po podgrupama s pripadajućim serotipovima te bolestima čiji su uzročnici.

| Podgrupa | Serotip | Bolesti koje uzrokuju |
|----------|--|--|
| A | 12, 18, 31, 61 | bolesti gastro-intestinalnog i dišnog sustava |
| B | 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66 | bolesti dišnog i gastro-intestinalnog sustava, urinarnog trakta, jetre i oka |
| C | 1, 2, 5, 6, 57 | bolesti dišnog i gastro-intestinalnog sustava, jetre i oka |
| D | 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 67 | bolesti gastro-intestinalnog sustava, oka i tonzila |
| E | 4 | bolesti dišnog sustava i oka |
| F | 40, 41 | bolesti gastro-intestinalnog sustava |
| G | 52 | bolesti gastro-intestinalnog sustava |

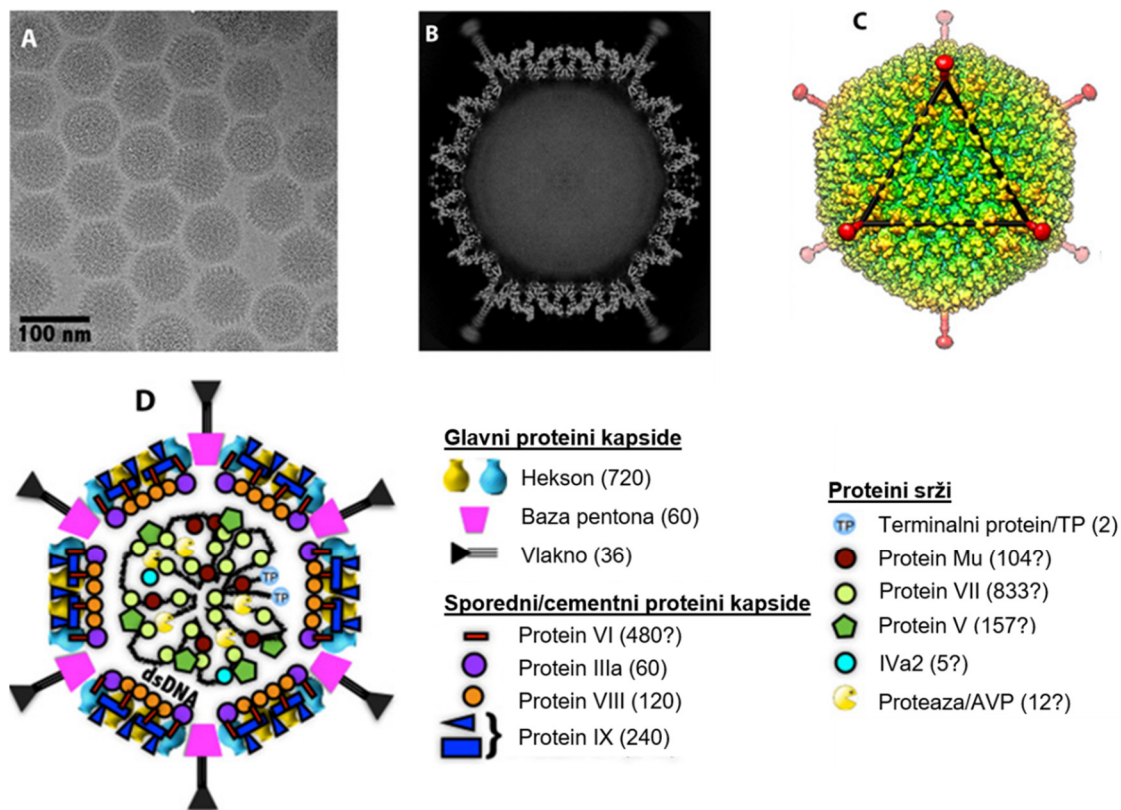
1.2. Struktura adenovirusa čovjeka

Adenoviralna čestica ima promjer oko 90 nm i masu oko 150 megadaltona što se razlikuje između različitih serotipova. HAdV se sastoji od 13 strukturnih proteina koji čine vanjsku kapsidu ikozaedralne geometrije i unutrašnju srž gdje je sa strukturnim proteinima vezana dvolančana DNA duljine 36 kb. Detalji strukturnih proteina navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Strukturni proteini HAdV. Količina pojedinog proteina po virionu prikazana je za HAdV5.

| | Protein | Količina po virionu i smještaj |
|----------------|--------------------|--|
| Kapsida | Hekson (II) | 240 trimera polipeptida II, glavni protein kapside |
| | Baza pentona (III) | 12 pentamera polipeptida III, glavni protein kapside |
| | Vlakno (IV) | 12 trimera polipeptida IV, glavni protein kapside |
| | IIIa | 60 monomera proteina vezanog za hekson |
| | VI | protein vezan za hekson, 60 heksamera |
| | VIII | 120; protein vezan za hekson |
| | IX | protein vezan za hekson, 80 heksamera |
| Srž | V | 180; DNA-vezujući protein |
| | VII | 800; DNA-vezujući protein |
| | Mu (X) | 100; 19 ak dugačak DNA-vezujući protein |
| | TP | 2; terminalni protein, vezan na krajevima DNA |

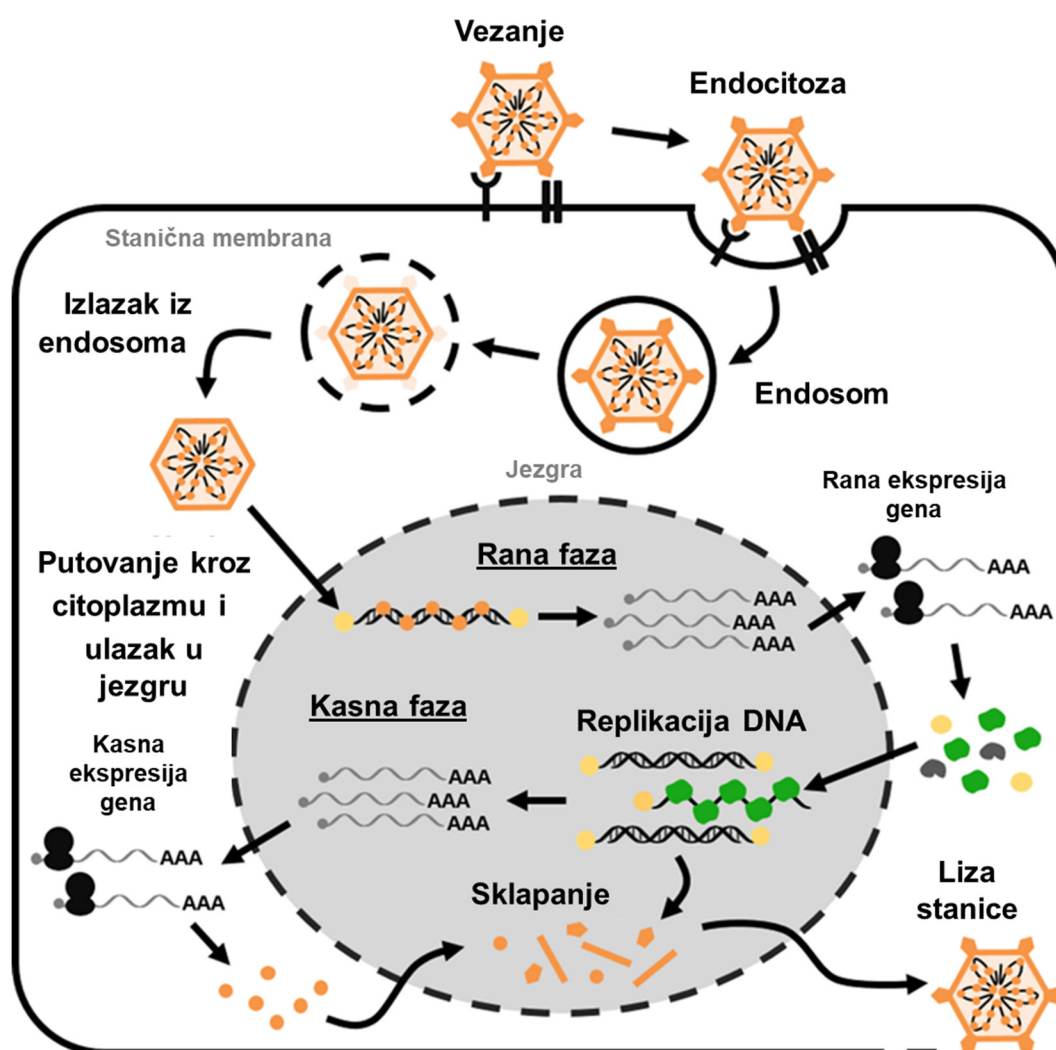
Shematski prikaz adenoviralne čestice prikazan je na Slici 1. Proteini kapside podijeljeni su na glavne i sporedne (cementne proteine). Glavni proteini kapside čine 252 površinske kapsomere, od čega je 240 kapsomera na plohama i rubovima ikozaedralne kapside sastavljeno od proteina heksona, dok se 12 kapsomera nalazi na vrhovima ikozaedralne kapside i čine ga pentoni. Pojedini penton sastavljen je od proteina vlakna koji je nekovalentno vezan na protein bazu pentona. Kristalna struktura čitavih adenovirusa određena je za HAdV5 i HAdV26 (HAdV serotipa 26), dok su kristalne strukture pojedinih proteina određene za mnoge serotipove HAdV (Yu i sur., 2017; Liu i sur., 2010; Zubieta i sur., 2005).



Slika 1. Ukupna struktura i organizacija proteina kapsida u HAdV26. (A) Reprezentativni mikrograf smrznutih hidratiziranih viriona. (B) Prerez kroz središte viriona. (C) Radijalni prikaz površine rekonstrukcije viriona nakon krioelektronske mikroskopije. Jedna ikozaedralna površina prikazana je crnim trokutom. (D) Shematski prikaz organizacije proteina adenovirusa. Popis simbola i proteina koje oni predstavljaju prikazan je s desne strane. Brojevi kopija pojedinog polipeptida proteina naznačeni su u zagradama. „?“ označava vjerojatni broj kopija polipeptida određenih krioelektronskom mikroskopijom. (preuzeto i prilagođeno iz Yu i sur., 2017).

1.3. Životni ciklus adenovirusa

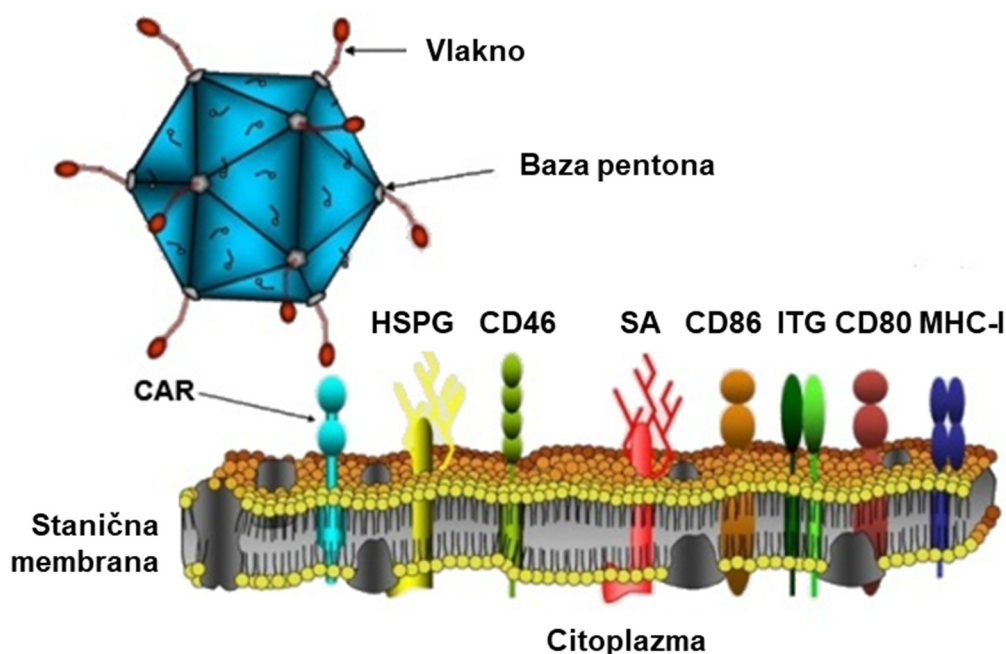
Životni ciklus adenovirusa može se pojednostavljeno podijeliti u nekoliko faza: vezanje, ulazak u stanicu endocitozom, oslobađanje iz endosoma, putovanje kroz citoplazmu, ulazak u jezgru, ekspresiju ranih i kasnih gena, sklapanje novih viralnih čestica i njihov izlazak iz stanice. Shematski prikaz životnog ciklusa adenovirusa prikazan je na Slici 2, a u predstojećim poglavljima su faze detaljnije opisane.



Slika 2. Pregled životnog ciklusa adenovirusa čovjeka. Nakon vezanja i ulaska adenovirusa endocitozom, oslobađanja iz endosoma, putovanja do jezgre i ulaska adenoviralnog genoma u jezgru stanice domaćina, započinje rana ekspresija gena adenovirusa čiji proteini uključuju stanične mehanizme za replikaciju adenoviralnog genoma. Početak replikacije adenoviralne DNA označava napredovanje iz rane u kasnu fazu infekcije i preduvjet je za kasnu ekspresiju gena, sintezu adenoviralnih strukturnih proteina i sklapanje viriona (preuzeto i prilagođeno iz Charman i sur., 2019).

1.3.1. Vežanje adenovirusa na površinu stanica

Početni kontakt između adenovirusa i stanica ostvaruje se putem interakcija vlakna i baze pentona s receptorima eksprimiranim na vanjskoj površini stanice. Do danas je pokazano mnogo molekula na površini stanica na koje se HAdV mogu vezati: CAR (engl. *Coxsackie and Adenovirus Receptor*), integrini, CD46, dezmgolein-2, sijalinska kiselina, heparansulfat proteoglikani, glavni kompleks tkivne snošljivosti I, CD80, CD86 i drugi (Slika 3).



Slika 3. Molekule uključene u vežanje adenovirusa čovjeka na površinu stanica. Kratice: HSPG - heparansulfat proteoglikani, SA – sijalinska kiselina, ITG – integrini, MHC-I – glavni kompleks tkivne snošljivosti I. (preuzeto i prilagođeno iz Bru i sur., 2010).

HAdV podgrupa A, C, D, E i F kao primarni receptor koriste CAR (Bergelson i sur., 1997; Kirby i sur., 2001; Roelvink i sur., 1998). CAR je transmembranski protein koji pripada superobitelji imunoglobulina, eksprimiran je na bazolateralnoj strani polariziranih epitelnih stanica i lateralnoj strani mnogih tkiva (Raschperger i sur., 2006) te je uključen u formiranje čvrstih spojeva (engl. *tight junctions*) i prijanjajućih spojeva (engl. *adherens junction*) između epitelnih stanica homotipskim interakcijama, te na taj način sudjeluje u održavanju homeostaze tkiva (Loustalot i sur., 2016). Važnu ulogu za mogućnost vežanja na CAR imaju i dužina i fleksibilnost drška vlakna HAdV (Ambriović-Ristov i sur., 2003). CAR omogućuje vežanje HAdV na površinu stanice,

ali ne i njihov ulazak, dok posreduje ulazak psećeg adenovirusa serotipa 2 u neurone (Kremer i Nemerow, 2015). C-terminalni rep CAR nije potreban za infekciju stanica s HAdV, ali putem aktivacije mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) ERK (engl. *Extracellular Receptor Kinase*) sudjeluje u upalnom odgovoru stanice i ekspresiji citokina (Loustalot i sur., 2016; Stasiak i Stehle, 2020; Arnberg, 2012).

Integrini su heterodimerni transmembranski proteini sastavljeni od jedne α i jedne β podjedinice. U ljudi ukupno postoji 18 α podjedinica i 8 β podjedinica koje međusobno mogu tvoriti 24 heterodimera čija uloga u stanici je kontrola adhezije, proliferacije i ekspresije gena uslijed vezanja na komponente izvanstaničnog matriksa i druge stanice (Campbell i Humphries, 2011). Svaka podjedinica integrina ima više domena koje omogućuju veliku konformacijsku fleksibilnost, od neaktivne zatvorene do aktivne otvorene konformacije koja je povezana s aktivacijom signalnih puteva (Ginsberg, 2014). Svi HAdV podgrupa A-E i G se na integrine vežu RGD slijedom iz baze pentona (Arnberg, 2012). Vezanje HAdV na pojedini integrin potiče njihovo nakupljanje što okida signale za ulazak HAdV u stanicu receptor-posredovanom endocitozom. Dosad je pokazano da su integrini $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha3\beta1$ i $\alpha5\beta1$ uključeni u ulazak HAdV (Arnberg, 2012). Za serotipove HAdV kojima primarni receptor CAR omogućuje vezanje, integrini služe kao koreceptori koji omogućuju ulazak adenoviralne čestice, međutim, u pojedinim staničnim linijama je pokazano da u odsutnosti CAR integrini mogu poslužiti i kao primarni receptori (Huang i sur., 1996; Arnberg, 2009; Stasiak i Stehle, 2020; Arnberg, 2012).

CD46 je membranski glikoprotein koji pripada obitelji proteina naziva regulatori aktivacije komplementa (engl. *Regulators of Complement Activation*, RCA) i njegova je glavna funkcija da štiti stanicu od razgradnje posredovane komplementom (Wojnicz i sur., 2002). Ekspimiran je na svim stanicama s jezgrom, a za razliku od CAR nije ograničen samo na čvrste spojeve između stanica (Ni Choileain i Astier, 2012). Uslijed interakcije s CD46 aktivira se makropinocitoza i smanjuje se količina CD46 na površini stanice. CD46 je receptor za HAdV podgrupe B s velikim (serotipovi 11, 16, 21, 35) ili malim afinitetom (serotipovi 3, 7, 11, 14) (Arnberg, 2012; Gaggar i sur, 2003; Marttila i sur, 2005; Segerman i sur., 2003). Osim podgrupe B, pokazano je da CD46 vežu i HAdV podgrupe D (Andersson i sur., 2010; Li i sur., 2012; Liu i sur, 2018).

Dezmoglein-2 je transmembranski glikoprotein koji pripada obitelji kadherina. Zajedno s dezmosolinom tvori heterodimere koji su uključeni u adhezije između stanica koje nazivamo dezmosomi. Dezmgolein-2 je identificiran kao receptor visokog afiniteta za

HAdV serotipa 3, 7, 11 i 14 podgrupe B, iako se oni mogu vezati malim afinitetom i na CD46. Zanimljiva posljedica vezanja HAdV na dezoglein-2 je poticanje epitelno-mezenhimalne tranzicije uslijed koje dolazi do oslabljivanja međustaničnih veza i povećavanja dostupnosti drugih receptora koji se nalaze u čvrstim i prijanjajućim spojevima, kao što su CAR i CD46 (Wang i sur., 2011; Arnberg, 2012; Stasiak i Stehle, 2020).

Sijalinska kiselina je monosaharid i derivat neuraminske kiseline koja je u čovjeka vezana na glikoproteine i gangliozide, najčešće na površini stanica. Pokazano je da se vrhom glave vlakna HAdV povezani s infekcijama oka serotipa 8, 19p, 37, 53, 54 i 64 podgrupe D vežu na sijalinsku kiselinu (Burmeister i sur., 2004; Chandra i sur., 2019; Stasiak i Stehle, 2020). Nedavno je pokazano da i glava vlakna HAdV26 može uspostaviti interakcije sa sijalinskom kiselinom (Baker i sur., 2019) kao i da je polisijalinska kiselina receptor za HAdV serotipa 52 (HAdV52) podgrupe G (Lenman i sur., 2018).

Od ostalih interakcija adenovirusa s molekulama ili receptorima stanica koje nisu detaljno razjašnjene pokazano je da KKTK (lizin-lizin-treonin-lizin) slijedi u trećem ponavljanju drška vlakna HAdV5 omogućava vezanje na heparan sulfat proteoglikane (Smith i sur., 2003), glava vlakna HAdV5 omogućava vezanje na $\alpha 2$ domenu glavnog kompleksa tkivne snošljivosti I u epitelnim stanicama čovjeka te B-limfoblastoidnoj staničnoj liniji (Hong i sur., 1997), a HAdV podgrupe B koriste CD80 i CD86 kao receptore za vezanje na stanice (Short i sur., 2006). Pokazano je da HAdV5 u dendritičke stanice ulazi korištenjem CLR DC-SIGN (Adams i sur., 2009).

U *in vivo* studijama je pokazano da se vezanjem faktora koagulacije krvi ovisnima o vitaminu K – faktor VII (FVII), faktor IX (FIX) i faktor X (FX), na heksone adenoviralnih čestica onemogućava uobičajeno vezanje pojedinog serotipa i mijenja se njihov tropizam prema hepatocitima (Allen i Byrnes, 2019). Osim koagulacijskih faktora, tzv. receptori čistači (engl. *scavenger receptors*) mijenjaju tropizam adenovirusa usmjeravajući ih prema jetri, točnije prema Kupfferovim stanicama (Arnberg, 2009).

1.3.2. Ulazak adenovirusa endocitozom

Ubrzo nakon vezanja na odgovarajući receptor, adenovirusi ulaze u stanicu. Kod HAdV2 i HAdV5 nakon interakcije vlakna s CAR dolazi do vezanja RGD slijeda iz baze

pentona na integrine, što pokreće njihov ulazak klatrinom posredovanom endocitozom (Meier i Greber, 2004). Krioelektronskom mikroskopijom i biokemijskim analizama je pokazano da se HAdV2 i HAdV12 RGD slijedom iz baze pentona vežu na $\alpha\beta 5$ integrine (Chiu i sur., 1999). Vežanje na $\alpha\upsilon$ integrine: $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ (Arnberg, 2012) potiče njihovo nakupljanje (engl. *clustering*) i aktivaciju prijenosa signala, što uključuje aktivaciju PI3K, p130CAS i Rho obitelj malih GTPaza te dovodi do polimerizacije aktina i formiranja klatrinom obloženog mjehurića (Li i sur., 1998a; Li i sur., 1998b; Li i sur., 2000). HAdV19 iz podgrupe D potiče aktivaciju PI3K u stanicama rožnice oka (Rajala i sur., 2005). Za odvajanje klatrinom obloženog mjehurića kojim HAdV ulazi u stanicu važna je aktivnost dinamina-2, što je potvrđeno korištenjem dominantno negativne varijante dinamina-2 koji je smanjio ulazak HAdV2 i do 70% (Wang i sur., 1998). Meier i sur. (2002) su upotrebom dominantno negativnih varijanti proteina Eps15 i dinamina potvrdili da HAdV2 za ulazak u epitelne stanice koristi klatrinom posredovanu endocitozu i pritom aktivira prienos signala koji aktivira makropinocitozu. Makropinocitoza izravno ne posreduje u ulasku HAdV2, ali olakšava njegov ulazak klatrinom posredovanom endocitozom mehanizmom koji još nije u potpunosti razjašnjen. HAdV3 i HAdV35 iz podgrupe B ulaze u epitelne i hematopoetske stanice makropinocitozom nakon vezanja na CD46 (Kalin i sur., 2010; Amstutz i sur., 2008) u što su uključeni i $\alpha\upsilon$ integrini, F-aktin, Rho obitelj GTPaza i protein kinaza C.

Studije su pokazale da HAdV mogu ulaziti u stanice i endocitozom posredovanom lipidnim splavima i kaveolama. Tako HAdV5 koristi lipidne splavi i kaveole za ulazak u plazmocite (Colin i sur., 2005), dok HAdV37 ulazi u stanice rožnice oka čovjeka kaveolinom posredovanom endocitozom, ovisnom o kolesterolu i kaveolinu-1 (Yousuf i sur., 2013). Ista studija pokazuje da HAdV2 ne inficira stanice rožnice oka čovjeka, ali upućuje da u epitelne A549 stanice, HAdV2 ulazi kaveolinom posredovanom endocitozom. U kimernim HAdV, kojima je promijenjen tropizam promjenom vlakna HAdV s vlaknom adenovirusa koji ne inficira stanice čovjeka, pokazano je da tip ulaska adenovirusa mijenja iz klatrinom posredovane endocitoze kod nemodificiranog adenovirusa u ulazak adenovirusa putem lipidnih splavi i kaveolinom posredovane endocitoze kod modificiranog adenovirusa (Rogee i sur., 2007).

1.3.3. Unutarstanično putovanje adenovirusa

Adenovirusi se nakon ulaska u stanicu endocitozom nalaze u endosomima iz kojih moraju izaći da bi nastavili svoj put prema jezgri. Većina podataka o endosomalnom putovanju HAdV proizlazi iz istraživanja podgrupa B i C, čiji predstavnici ulaze u stanicu korištenjem različitih receptora i tipova endocitoze. Tako je pokazano da se HAdV7 podgrupe B nakuplja u lizosomima i pritom pokazuje kolokalizaciju s Rab7 i LAMP1, dok HAdV5 podgrupe C brzo putuje prema jezgri stanice. Optimalna pH vrijednost za lizu membrane endosoma kod podgrupe C odgovara pH vrijednosti ranih endosoma, dok kod podgrupe B odgovara pH vrijednosti kasnih endosoma ili lizosoma (Miyazawa i sur., 2001; Chardonnet i Dales, 1970; Miyazawa i sur., 1999). HAdV2 iz podgrupe C, baš kao i HAdV5, brzo izlazi iz EEA1 pozitivnih endosoma i ne ulazi u kasne endosome ovisno o Rab5 kao *Ad2-ts1* kojemu je zbog mutacije u proteazi L3/p23 onemogućen izlazak iz endosoma (Gastaldelli i sur., 2008). Također je pokazano da se HAdV26 iz podgrupe D zajedno s HAdV35 iz podgrupe B nakuplja u kasnim lizosomima A549 stanica (Teigler i sur., 2014). HAdV37 iz podgrupe D ulazi u stanice rožnice oka čovjeka nekanonskim putem neovisnim o EEA1, a ovisnim o LAMP1 (Lee i sur., 2020). Za razliku od HAdV5 koji brzo putuje prema jezgri i HAdV35 koji kolokalizira s LAMP1, biljegom kasnih endosoma i lizosoma, HAdV serotipa 41 (HAdV41) iz podgrupe F je raspršen po stanici i ne pokazuje kolokalizaciju s LAMP1 (Leung i sur., 2011).

Izlazak adenovirusa iz endosoma, najbolje je istražen za HAdV2 i HAdV5. Pokazano je da, tijekom ulaska u stanicu i putovanja kroz citoplazmu, adenoviralna čestica polako gubi proteine, što uključuje gubitak vlakna što bi mogao biti signal za rastavljanje adenoviralne čestice (Greber i sur., 1993). Kasnije je pokazano da se vlakno odvaja od kapside s vremenom poluraspada od 3 min tijekom endocitoze, dok se baza pentona odvaja mnogo kasnije (Martin-Fernandez i sur., 2004). Također, interakcija između CAR i vlakna te integrina i baze pentona dovodi do difuznog kretanja adenovirusa na membrani koje uzrokuje gubitak vlakna i izlaganje proteina VI na površini kapside (Burckhardt i sur., 2011). Prijašnje studije su ukazivale da snižavanje pH vrijednosti endosoma na pH 6.0 također uzrokuje konformacijske promjene u kapsidi (Leopold i Crystal, 2007), ali nedavno je pokazano da izlazak adenovirusa iz endosoma ipak nije ovisan o niskoj pH vrijednosti (Suomalainen i sur., 2013), već da protein VI destabilizira membranu endosoma neovisno o pH vrijednosti. Protein VI se nalazi s unutrašnje strane kapside i usidren je ispod peripentonskih heksona. Pomoću

AVP se tijekom konformacijskih promjena u kapsidi cijepa N-terminalni dio proteina VI i izlaže α -uzvojnica koja se ubacuje u membranu i uz interakcije s lipidnom membranom endosoma stvara pore koje posljedično uzrokuju razaranje membrane i oslobađanje djelomično rastavljenih adenoviralnih čestica u citosol (Wiethoff i sur., 2005; Moyer i sur., 2016; Maier i sur., 2010).

Nakon što uspješno izađe iz endosoma, djelomično rastavljena adenoviralna čestica putuje prema jezgri kako bi se u nju unio genom adenovirusa. Citoplazma je viskozna i puna različitih staničnih dijelova što sprječava pasivnu difuziju adenoviralne čestice do jezgre. Kako bi došli do jezgre, HAdV se vežu za motorni protein dinein koji ih, koristeći mikrotubule, prenosi prema središtu organizacije mikrotubula (engl. *microtubule organizing center*, MTOC). Nekoliko studija opisuje putovanje HAdV pomoću motornih proteina kinezina (Scherer i sur., 2020), kao što je Kif5b (Zhou i sur., 2018). Snimanjem putovanja HAdV u živim stanicama utvrđeno je da adenoviralne čestice mogu putovati i prema minus (–) i prema plus (+) kraju mikrotubula (Gazzola i sur., 2009). U *in vitro* studijama je pokazano da se HAdV podgrupe C vežu heksonom s dineinom preko interakcija s intermedijerom i lakim lancima dineina te putuju prema (–) kraju mikrotubula do MTOC. Inhibicijom dineina onemogućeno je nakupljanje HAdV oko jezgre (Leopold i Crystal, 2007). Pritom je za vezanje heksona nužna fosforilacija lakog lanca dineina (Scherer i sur., 2014), a i sam hekson prolazi kroz konformacijske promjene koje mu omogućuju vezanje na dinein preko hipervarijabilne petlje 1 (HVR1) (Scherer i Vallee, 2015). Moguće je da i ostali proteini kapside sudjeluju u putovanju virusa putem mikrotubula. Tako je pokazano da PPxY motiv iz proteina VI olakšava putovanje HAdV koje je ovisno o mikrotubulima (Wodrich i sur., 2010). Adenoviralne čestice se moraju odvojiti od mikrotubula kako bi se vezale na jezgru, međutim mehanizam je još uvijek nepoznat. Pokazano je da nakon uklanjanja jezgre u stanicama, HAdV ostaju vezani za mikrotubule što upućuje da proteini jezgre imaju ulogu u hvatanju i odvajanju adenovirusa od mikrotubula (Bailey i sur., 2003).

1.3.4. Unos genoma adenovirusa u jezgri

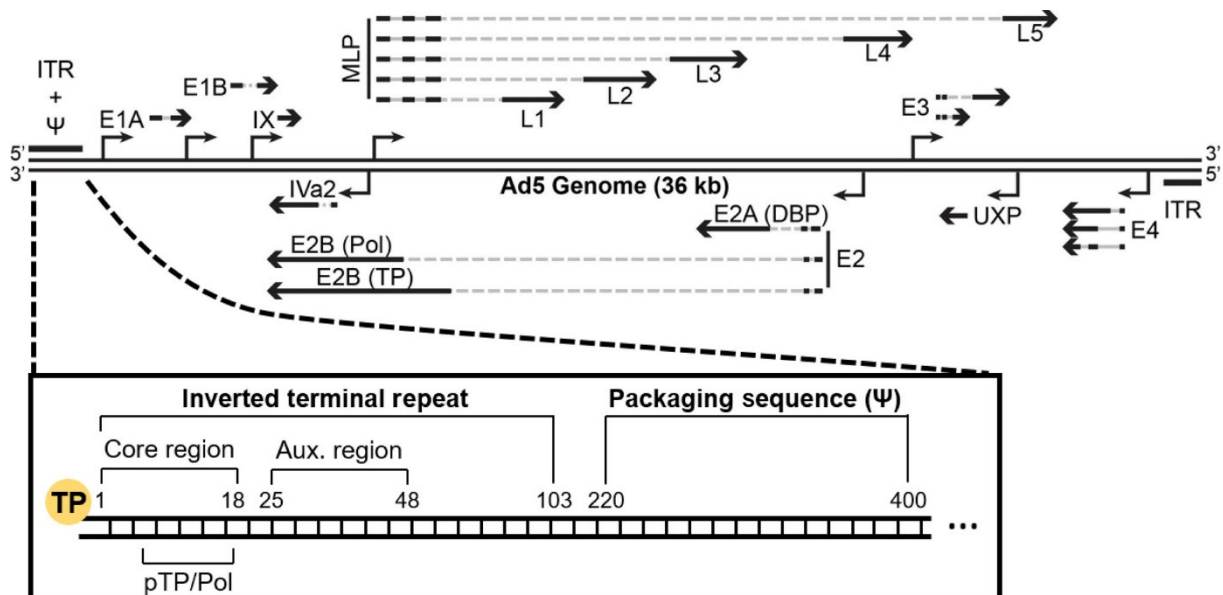
Kompleksi molekula veći od 40 nm ne mogu ući u jezgru pasivnom difuzijom zbog čega se, nakon približavanja jezgri, djelomično rastavljena adenoviralna čestica veže na kompleks jezgrine pore (engl. *nuclear pore complex*, NPC) i u jezgru ubacuje samo

genom kovalentno vezan s proteinima srži adenovirusa: TP, VII i Mu (Puntener i sur., 2011), dok kapsida ostaje u citosolu u perinuklearnom području (Pante i Kann, 2002). Vezanje na NPC ostvaruje se putem heksona koji stabilno vežu N-terminalnu domenu citoplazmatskog filamentoznog proteina Nup214 koji je dio NPC. Strunze i sur. (2011) su predložili molekularni mehanizam prema kojem se djelomično rastavljena adenoviralna čestica proteinom IX veže s kinezinom-1, molekularnim motorom koji se giba prema (+) kraju mikrotubula. Istovremeno se kinezin-1 s teškim lancem veže na protein Nup358 i druge NPC proteine. Kretanje kinezina-1 uzrokuje otpuštanje proteina kapside i istiskivanje proteina Nup358, Nup214 i Nup62 iz centralnog kanala NPC. Tako oslobođeni genom se potom unosi preko otvorenog kanala NPC u jezgru (Saphire i sur., 2000; Trotman i sur., 2001; Hindley i sur., 2007). Uz značajne razlike između pojedinih staničnih linija, čak 50 – 90% genoma adenovirusa ostaje u citosolu što upućuje da je NPC ograničavajući faktor za unos adenoviralnog genoma (Wang i sur., 2013).

1.3.5. Transkripcija i replikacija adenovirusa te sklapanje adenoviralnih čestica i njihov izlazak iz stanice

Nakon ulaska genoma HAdV u jezgru stanice domaćina pokreće se ekspresija gena za sintezu strukturnih proteina adenovirusa i replikaciju adenoviralne DNA. Genom HAdV čini linearna dvolančana DNA veličine 30-36 kb. Shematski prikaz genoma HAdV5 prikazan je na Slici 4. Na svojim krajevima DNA adenovirusa ima *cis*-djelujuće obrnuto ponavljajuće sljedove (engl. *inverted terminal repeats*, ITR) koji su potrebni za replikaciju adenoviralne DNA. U blizini lijevog ITR nalazi se *cis*-djelujući slijed za pakiranje (ψ) nužan za enkapsidaciju adenoviralne DNA. Ovisno o tome eksprimiraju li se prije ili nakon početka DNA replikacije, geni su podijeljeni na rane i kasne. U rane gene spada šest transkripcijskih jedinica: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4, čiji proteinski produkti omogućavaju replikaciju adenoviralne DNA. Kasni geni eksprimiraju se sa zajedničkog glavnog kasnog promotora (engl. *major late promoter*, MLP), čija pre-mRNA podliježe alternativnom prekrajanju i diferencijalnoj poliadenilaciji rezultirajući s 5 kasnih transkripcijskih jedinica (L1, L2, L3, L4, L5). Kasni geni kodiraju za strukturne proteine adenovirusa kao i za proteine koji sudjeluju u sklapanju novih adenoviralnih čestica. Osim ranih i kasnih gena postoje i intermedijarni geni (IVa2, IX, VAI, VAII) čiji produkti pomažu u transkripciji kasnih gena i sklapanju novih adenoviralnih čestica

(Charman i sur., 2019). Nedavno je karakteriziran još jedan promotor s odgovarajućim genom koji kodira za U egzon protein (engl. *U exon protein*, UXP), za koji se smatra da ima ulogu u replikaciji viralnog genoma (Ying i sur., 2010; Tollefson i sur., 2007).



Slika 4. Organizacija genoma HAdV5. Strelice označavaju smjer transkripcije gena kao i obrnutoponavljajućih slijedova na krajevima genoma (ITR) te slijeda za pakiranje (Ψ). Uvećani dio pokazuje detaljniji uvid u organizaciju lijevog kraja genoma s mjestom za vezanje preinicijskog kompleksa (pTP/Pol). TP označava terminalni protein vezan na krajevima genoma (preuzeto i prilagođeno iz Charman i sur., 2019).

Replikacija adenoviralnog genoma je vrlo efikasna i unutar 40 h može se sintetizirati i do milijun kopija genomske DNA. Sklapanje adenoviralnih čestica u jezgri stanice počinje 8 h nakon infekcije čime nastaje 10^4 - 10^5 viralnih čestica po stanici koje se otpuštaju zrele, 30-40 h nakon infekcije (Büchen-Osmond, 2003).

1.4. Odgovor imunskog sustava na infekciju s adenovirusima

Imunosni sustav čovjeka razvio je niz mehanizama za borbu protiv viralnih infekcija, dok suprotno, adenovirusi imaju mehanizme za onemogućavanje djelovanja imunskog sustava stanica protiv sebe kako bi omogućili svoje umnažanje i širenje. Tijekom infekcije, adenovirusi i stanice uspostavljaju niz interakcija koje dovode do aktivacije imunskog sustava stanica i uključuju aktivaciju sistemskog proupalnog

stanja, privlačenje citotoksičnih stanica na mjesto infekcije s ciljem uklanjanja patogena te slanje signala susjednim nezaraženim stanicama (Hendrickx i sur., 2014). Prva linija obrane od adenovirusa je urođeni imunski sustav čovjeka koji prepoznaje patogenom povezane molekularne uzorke (engl. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*, PAMP) adenovirusa tijekom cijelog puta infekcije: od proteina adenovirusa tijekom vezanja na receptore na površini stanice i ulaska, do DNA u citosolu ili jezgri stanice. PAMP adenovirusa su prepoznati od strane receptora za prepoznavanje uzoraka (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR). Karakterizirana su četiri tipa PRR u ljudi: Toll-slični receptori (engl. *Toll-like receptors*, TLR), NOD-slični receptori (engl. *NOD-like receptors*, NLR), lektinski receptori tipa C (engl. *C-type lectin receptors*, CLR) i receptori slični genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (engl. *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors*, RLR).

U čovjeku je dosad identificirano 10 tipova TLR koji se eksprimiraju s različitom lokalizacijom unutar stanica: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6 su transmembranski eksprimirani na površini stanice, dok su TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 smješteni u membrani endosoma (Takeuchi i Akira, 2010). Tijekom prepoznavanja PAMP putem TLR dolazi do promjena u prijenosu signala i ekspresiji različitih gena, ovisno o tipu stanica i adapterskim molekulama vezanim za pojedini tip TLR, među kojima su najpoznatije MyD88 i TRIF. Opisano je da DNA i kapsida adenovirusa, ali i transgen adenoviralnog vektora mogu aktivirati i TLR-ovisni i TLR-neovisni urođeni imunitet te pritom inducirati povećanu proizvodnju interferona (IFN) tipa I i drugih citokina (Zhu i sur., 2007; Appledorn i sur., 2008). Interakcija vlakna HAdV5 s CAR na epitelnim stanicama (primarne stanice epitela pluća, stanične linije A549 i Calu-3) potiče proizvodnju IL-8 aktiviranjem ERK1/2 i JNK ili AKT i S6K (Tamanini i sur., 2006; Kotha i sur., 2015), dok vezanje HAdV35 na CD46 inducira proizvodnju IFN γ i IL-10 u CD4⁺ T limfocitima (Kemper i sur., 2003). Vezanje herpesvirusa čovjeka tipa 6 na CD46 smanjuje proizvodnju IL-12 u perifernim stanicama krvi (Smith i sur., 2003). U perifernim stanicama krvi također je pokazano da dolazi do smanjenja proizvodnje IL-12 nakon infekcije s HAdV serotipa 16, 35 i 37, ali ne i serotipa 2 i 5 (Iacobelli-Martinez i sur., 2005). Osim povećanja u proizvodnji citokina nakon infekcije s HAdV primjećeno je i smanjenje upalnih citokina i fosforilacije Src proteina u ovisnosti o MyD88 nakon infekcije s HAdV37 primarnih stanica rožnice oka čovjeka te *in vivo* u rožnicu oka miša (Zhou i sur., 2017).

NLR su uključeni u nastanak unutarstaničnog multiproteinskog kompleksa zvanog inflammasom, a koji preko NF- κ B prijenosa signala dovodi do aktivacije kaspaze-1: proteaze koja ima ključnu ulogu u sazrijevanju proupalnih citokina IL-1 β i IL-18 te gasdermina D koji sudjeluje u piroptozu, obliku stanične smrti koji je pokrenut proupalnim signalima. Kompleks inflammasoma čine citosolni senzor, adapterski protein i prokaspaza-1 (Wen i sur., 2013). HAdV5 je aktivirao piroptozu stanica formiranjem inflammasoma preko citosolnog senzora AIM2 i adapterskog proteina ASC što je dovelo do aktiviranja kaspaze-1 i sazrijevanja IL-1 β te gasdermina D (Eichholz i sur., 2016). Kao dominantni citosolni senzor strane DNA nedavno je opisana senzorska kaskada cGAS/STING/TBK1 koja je odgovorna za poticanje proizvodnje IFN-I nakon infekcije s HAdV5 (Lam i sur., 2014).

RLR prepoznaju stranu RNA i pokreću mehanizme urođene imunosti, a zajedno sa signalima TLR moduliraju i stečenu imunost (Loo i Gale, 2011). Pokazano je da VA RNA HAdV može biti prepoznata putem RLR što potiče proizvodnju IFN I te da RLR zajedno s TRIM21 i citosolnim senzorom cGAS sudjeluju u prepoznavanju HAdV nukleinskih kiselina (Watkinson i sur., 2015; Minamitani i sur., 2011).

Što se tiče urođenog staničnog odgovora, pokazano je da adenoviralna infekcija potiče NK stanice (prirodne stanice ubojice, engl. *natural killer cells*) na citotoksično djelovanje kao i sekreciju imunomodulacijskih citokina u staničnoj kulturi i u *in vivo* studijama. Tako je pokazano da HAdV5 i HAdV35 aktiviraju NK stanice u perifernim stanicama krvi i primarnim fibroblastima čovjeka (Tomasec i sur., 2007; Pahl i sur., 2012) te u miševima (Zhu i sur., 2008). Zanimljivo, pokazano je da E3 protein E3/49K jedinstven za podgrupu D HAdV onemogućava aktivaciju i djelovanje NK stanica, ali i T stanica (Windheim i sur., 2013), prema mehanizmu koji još nije u potpunosti razjašnjen.

Osim urođenog, infekcija s HAdV potiče i stečeni odgovor imunosti putem CD4⁺ pomoćničkih i CD8⁺ citotoksičnih T limfocita kao i B limfocita i njihovih neutralizirajućih protutijela. Pokazano je da su heksoni glavni epitopi koji potiču CD4⁺ T limfocite i to njihovi konzervirani slijedovi. Pritom CD4⁺ T limfociti dobiveni infekcijom jednog serotipa HAdV mogu štiti organizam od više serotipa HAdV iz različitih podgrupa (Heemskerk i sur., 2006; Veltrop-Duits i sur., 2006). CD8⁺ citotoksični T limfociti prepoznaju kapsidne proteine hekson, vlakno i bazu pentona, kao i Ad Pol (Joshi i sur., 2009; Tang i sur., 2006) te daju višefunkcionalni odgovor uključujući i efektorski kao što je sinteza perforina koji sudjeluju u lizi inficirane stanice (Hutnick i sur., 2010).

Sintezu neutralizirajućih protutijela mogu potaknuti sva tri glavna proteina kapside, hekson, vlakno i baza pentona, ali samo hekson izaziva dovoljno jak imunski odgovor i sintezu neutralizirajućih protutijela koja imaju zaštitnu ulogu. Usporedbom slijeda aminokiselina u heksonu detektirano je nekoliko hipervarijabilnih petlji koje se jako razlikuju između različitih serotipa HAdV i pokazano je da su upravo one glavna meta za vezanje neutralizirajućih protutijela. Upravo zbog te različitosti hipervarijabilnih petlji, odgovor neutralizirajućim protutijelima ograničen je na pojedini serotip HAdV i nema unakrsne neutralizacije protutijelima različitih serotipova (Crawford-Miksza i Schnurr, 1996, Fausther-Bovendo i Kobinger, 2014).

1.5. Viralni vektori

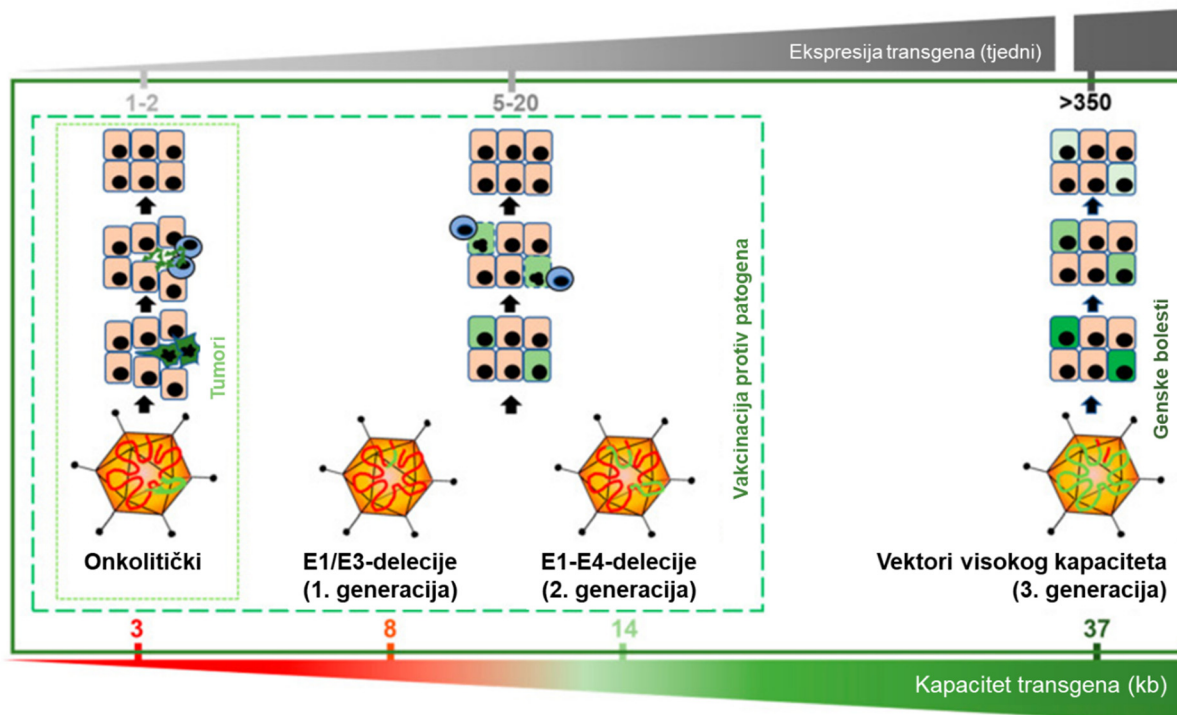
Prirodno svojstvo virusa da doprema genski materijal u stanice iskorišteno je za konstrukciju viralnih vektora. Pritom se virusi genetički modificiraju kako se ne bi umnažali u organizmu (replikacijski defektni vektori) ili bi se umnažali uvjetno samo u ciljnim stanicama (Choi i Chang, 2013). Viralni vektori unose u stanicu transgen koji ima terapijski učinak i koji se može ugraditi u genom stanice ili ostati episomalno ovisno o tipu virusa koji se koristi i svrsi terapije (Lukashev i Zamyatnin, 2016). Rekombinantni viralni vektori predstavljaju efikasnu tehnologiju za isporučivanje transgena i posljedično heterolognog proteina. Do sada je korišteno mnoštvo virusa u konstrukciji viralnih vektora, kao što su adenovirusi, retrovirusi, lentivirusi, adeno-pridruženi virusi, herpesvirusi i drugi. Među njima, zbog snažne i prolazne ekspresije transgena vektori temeljeni na adenovirusima su najčešće korišteni vektori u kliničkim istraživanjima u svrhu genske terapije tumora i vakcinacije (Abedia, 2020).

1.5.1. Konstrukcija adenoviralnih vektora

Kako bi se konstruirao replikacijski defektan adenoviralni vektor, smanjio imunski odgovor na vektor te osigurao prostor za ugradnju transgena, razvijeno je nekoliko generacija adenoviralnih vektora s obzirom na to koje su regije adenoviralnog genoma uklonjene (Ricobaraza i sur., 2020) (Slika 5). U prvoj generaciji je iz adenoviralnog genoma uklonjeno E1 područje čiji proteini uslijed interakcija s proteinima stanica aktiviraju i reguliraju transkripciju ostalih HAdV gena te reguliraju stanični ciklus,

apoptozu, diferencijaciju i imunski odgovor stanice (Liu i Marmorstein, 2007; Blackford i Grand, 2009) pa je time onemogućena aktivacija transkripcije ostalih viralnih gena ovisnih o E1 području te replikacija adenoviralne DNA. Uz E1 područje često je uklonjeno i E3 područje genoma čiji proteini sudjeluju u ometanju imunskog sustava stanice sprječavanjem prezentacije antigena na zaraženim stanicama i inhibicijom apoptoze inducirane citokinima (Wold, 1993; Bennett i sur., 1999) čime je osigurana manja imunogeničnost vektora i veći kapacitet za ugradnju transgena, koji za prvu generaciju vektora temeljenih na HAdV5 iznosi 8 kb. U drugoj generaciji replikacijski defektnih adenoviralnih vektora je uz E1/E3 područje djelomično ili potpuno uklonjeno i E2 i/ili E4 područje genoma i time se dodatno povećao kapacitet za ugradnju transgena na 14 kb te je dodatno smanjena imunogeničnost vektora (Ricobaraza i sur., 2020). Treću generaciju predstavljaju vektori visokog kapaciteta (engl. *high capacity, gutless*) koji sadrže samo ITR sljedove na krajevima genoma i pakirajući slijed. Njihov kapacitet za ugradnju egzogene DNA iznosi 37 kb. Međutim, kako je ekspresijska kazeta transgena uobičajeno manja, u vektore visokog kapaciteta mora se ugraditi nespecifična DNA kako bi se postigla minimalna veličina genoma koja omogućuje stabilno pakiranje u kapsidu i koja u slučaju HAdV5 iznosi oko 28 kb (Alba i sur., 2005). Za umnažanje adenoviralnih vektora prve i druge generacije koriste se komplementirajuće stanice kao što su HEK-293 ili PER.C6 koje *in trans* nadomještaju uklonjena područja genoma adenovirusa, dok umnažanje adenoviralnih vektora visokog kapaciteta zahtijeva pomoćnički virus (engl. *helper virus*) koji se potom mora ukloniti što otežava pročišćavanje takvih vektora (Wold i Toth, 2013; Majhen i sur., 2014; Ricobaraza i sur., 2020).

Osim replikacijski defektnih adenoviralnih vektora, konstruirani su i uvjetno replikacijski kompetentni adenoviralni vektori koji se specifično mogu replicirati samo u stanicama tumora, ali ne i u normalnim zdravim stanicama (Baker i sur., 2018). Uvjetno replikacijski vektori imaju uklonjene gene odgovorne za regulaciju staničnog ciklusa i/ili su im ti geni pod kontrolom tkivno/tumor specifičnog promotora (Talmadge i Cowan, 2020).



Slika 5. Vrste adenoviralnih vektora i njihove potencijalne terapijske primjene. Onkolitički adenovirusi zadržavaju većinu virusnog genoma, uključujući regiju E1, koja je potrebna za replikaciju. Oni mogu primiti do 3 kb egzogene DNA ako je E3 regija djelomično uklonjena. Budući da repliciraju svoje genome i uzrokuju lizu zaraženih stanica, ekspresija transgena je vrlo intenzivna, ali prolazna. Replikacijski defektni vektori prve i druge generacije ne uzrokuju izravno uništavanje inficiranih stanica, a imunski odgovor stanice može ograničiti stabilnost ekspresije transgena. Koriste se u vakcinaciji te prijenosu gena *in vitro* i *in vivo*. Vektori visokog kapaciteta su prikladni za sve *in vivo* primjene. Nedostatak ekspresije viralnih gena smanjuje stanični imunski odgovor na takve vektore što omogućava dugotrajnu ekspresiju transgena. Navedeno trajanje ekspresije transgena temelji se na transdukciji jetre u čovjekolikim majmunima i može biti različito u drugim domaćinima i tkivima. (preuzeto i prilagođeno iz Ricobaraza i sur., 2020)

1.5.2. Upotreba adenoviralnih vektora

S obzirom na dugogodišnje istraživanje i upotrebu, biologija adenoviralnih vektora je dobro poznata. Rekombinantni adenoviralni vektori inficiraju široki spektar mirujućih stanica kao i onih u diobi, a nakon ulaska u jezgru njihova se DNA ne ugrađuje u genom, već ostaje episomalno čime ne postoji rizik od insercijske mutageneze i povećana je sigurnost ovih vektora (Wold i Toth, 2013). Ipak, to omogućava samo prolaznu ekspresiju unešenog gena, što ograničava njihovu upotrebu za gensku terapiju u užem smislu za monogenske bolesti, ali je povoljno za gensku terapiju tumora kao i korištenje kao vektora u vakcinaciji. Prednosti adenoviralnih vektora su i mogućnost proizvodnje u visokom titru, relativno jednostavna manipulacija genoma te visok kapacitet za ugradnju transgena (Wold i Toth, 2013).

Izazov u korištenju adenoviralnih vektora je kako inficirati samo ciljne stanice. Kako bi se povećala specifičnost vezanja adenoviralnih vektora samo na ciljne stanice i tkiva, adenoviralnim vektorima se može promijeniti tropizam pomoću transkripcijskog ili transdukcijskog preusmjerenja (Barry i sur., 2020). Kod transkripcijskog preusmjerenja transgen unešen adenoviralnim vektorom se eksprimira s tkivno-specifičnog promotora aktivnog samo u ciljnom tkivu. Transdukcijsko preusmjerenje uključuje kemijsku ili gensku modifikaciju adenoviralnog vektora tako da se vektor prvenstveno veže na ciljnu stanicu, npr. korištenjem bispecifične molekule koja se veže na protein kapside adenoviralnog vektora te na molekulu na ciljnoj stanici ili ugradnjom preusmjeravajućeg liganda koji će prepoznati specifični receptor na površini stanice (Coughlan i sur., 2010).

Adenoviralni vektori se istražuju za upotrebu u genskoj terapiji za liječenje genskih, ali i stečenih bolesti, poput tumora te se istražuju kao vektorske vakcine. Tako se npr. adenoviralni vektori koriste u genskoj terapiji za liječenje cistične fibroze, infarkta miokarda, makularne degeneracije, nedostatka ornitin transkarbamoilaze, upale žlijezde slinovnice i drugih. Kao vektorske vakcine koriste se za sprječavanje infektivnih bolesti kao što su Ebola virus, Zika virus, influenza virus, HIV (virus imunodeficijencije čovjeka, engl. *Human Immunodeficiency Virus*), malarija i druge (Anywaine i sur., 2019; Cox i sur., 2018; Barouch i sur., 2018; ClinicalTrials, 2020; EMA, 2020). U terapiji tumora, onkolitički vektori su za sada pokazali umjerenu učinkovitost u liječenju raznih tipova tumora kao što su tumori prostate, želuca, glave i vrata te drugih, ali učinkovitost je osjetno poboljšana kada se onkolitički vektori koriste uz kemoterapiju ili imunoterapiju (Baker i sur., 2018).

S obzirom da su adenoviralni vektori jako imunogenični te prilikom infekcije potiču i urođenu i stečenu imunost, koje se razlikuju ovisno o tipu stanice koje inficiraju i serotipu HAdV (Hendrickx i sur., 2014), razumijevanje i uvažavanje ovih snažnih odgovora imunosti važno je za procjenu upotrebe i sigurnosti vektora HAdV. Snažan odgovor urođene imunosti može potaknuti stečenu imunost prema vektoru, što u slučaju korištenja HAdV kao vektorske vakcine može povećati učinkovitost vakcine zbog adjuvantnog učinka vektora (Majhen i sur., 2014). Međutim, neutralizirajuća protutijela mogu spriječiti vektor da obavi svoju ulogu (Bradley i sur., 2012). Stoga je potreban razvoj novih strategija kako bismo izbjegli neželjeni imunosni odgovor domaćina protiv adenoviralnih vektora. Kako je koncentracija neutralizirajućih protutijela protiv HAdV5 u populaciji visoka (Abbink i sur., 2007), jedan od novih

pristupa je istraživanje i korištenje serotipova HAdV koji se u populaciji ljudi javljaju u niskoj seroprevalenciji. Neki od njih se već ispituju u pretkliničkim i kliničkim studijama kao vektorska cjepiva i to su HAdV serotipova 11, 26, 28 i 35 (ClinicalTrials, 2020).

1.6. Adenovirus čovjeka serotipa 26

HAdV26 je izoliran iz uzorka stolice još 1961. (Rosen i sur., 1961). Dvije godine kasnije provedena je studija u kojoj je pokazano da inokulacijom u oko čovjeka HAdV26 uzrokuje konjunktivitis koji doseže maksimum četvrti dan nakon inokulacije, upalu grla koja doseže maksimum deseti dan nakon inokulacije dok se HAdV26 u stolici detektirao i četrdeset dana nakon infekcije oka (Kasel i sur., 1963). Ipak, prirodni tropizam HAdV26 još uvijek nije poznat. HAdV26 pripada najvećoj podgrupi HAdV, podgrupi D, za čije je predstavnike pokazano da uzrokuju bolesti oka, gastrointestinalnog sustava i tonzila (Echavarria, 2008).

Krioelektronskom mikroskopijom određena je struktura HAdV26 s rezolucijom od 3.7 Å (Yu i sur., 2017). Ukupna struktura i organizacija čestice HAdV26 uglavnom je slična onoj HAdV5 i prikazana je na Slici 1. Kao i svi drugi HAdV iz podgrupa A-E te G i HAdV26 ima RGD slijed u bazi pentona koji omogućuje vezanje na integrine. Razlika u odnosu na HAdV5 jest duljina vlakna, tj. broj ponavljanja β -ploča u dršku vlakna gdje HAdV5 ima 22 ponavljanja, dok HAdV26 ima kratko vlakno sa samo 8 ponavljanja β -ploča. Osim u duljini vlakna, HAdV5 i HAdV26 se razlikuju prema hipervarijabilnim petljama u heksonu pri čemu je HVR1 kod HAdV26 kraća, dok se ostale HVR ne razlikuju po veličini, već samo slijedu aminokiselina. Razlike u strukturi HVR, osobito HVR7, dobro koreliraju s biokemijskim opažanjima da HAdV26 za razliku od HAdV5 ne veže faktore koagulacije ovisne o vitaminu K: FIX i FX (Allen i Byrnes, 2019).

Dosad je opisano da u infekciju stanica s HAdV26 mogu biti uključeni CAR, CD46, α v integrini, sijalinska kiselina te SR-A6. Vezanje HAdV26 na epitelnim stanicama koje ekspimiraju CAR pokazalo je da HAdV26 može vezati CAR, ali manje uspješno od HAdV5 (Chen i sur., 2010). Pritom stanice koje ne ekspimiraju CAR HAdV26 inficira bolje nego HAdV5, što upućuje da HAdV26 može koristiti i neke alternativne receptore koje HAdV5 ne koristi. U istoj studiji pokazano je da HAdV26 ne koristi CD46 (Chen i sur., 2010). Korištenjem epitelnih stanica s *de novo* ekspimiranim CAR ili CD46 pokazano je da HAdV26, kao i neki drugi serotipovi podgrupe D, može koristiti CD46

kao receptor, ali manje uspješno nego HAdV podgrupe B što upućuje na to da HAdV podgrupe D mogu koristiti i druge receptore osim CD46 (Abbink i sur., 2007). Nedavno je pokazano da je CD46 uključen u infekciju stanica periferne krvi s HAdV26 jer je korištenjem protu-CD46 monoklonskog protutijela pokazano smanjenje uspješnosti transdukcije s HAdV26 (Li i sur., 2012). Pritom su ciklički RGD peptidi djelomično smanjili uspješnost transdukcije s HAdV26 u epitelnim stanicama jetre čovjeka, dok je kombinacija protu-CD46 monoklonskog protutijela te cikličkih RGD peptida dokinula infekciju B stanica, što ukazuje na ulogu αv integrina te CD46 u infekciji s HAdV26. Korištenjem kimernog HAdV5 koji ima domenu glave od HAdV26 pokazano je da glava vlakna HAdV26 uspostavlja stabilne interakcije sa sijalinskom kiselinom, slabe interakcije s CAR, a ne uspostavlja interakcije s dezogleinom-2 ni s CD46. Takav rezultat upućuje da glava vlakna HAdV26 može koristiti sijalinsku kiselinu kao receptor, dok je mala vjerojatnost da je CAR primarni receptor za HAdV26 (Baker i sur., 2019). U alveolarnim stanicama sličnim makrofagima miša dobivenim iz jetre miša identificiran je još jedan receptor koji omogućava ulazak HAdV26, a to je receptor čistač SR-A6 (Stichling i sur., 2018). Ipak, receptori za HAdV26 u epitelnim stanicama čovjeka nisu dovoljno istraženi. Tip endocitoze kojim HAdV26 ulazi u stanice nije opisan, dok je unutarstanično putovanje ispitano samo u jednoj studiji koja predlaže da se HAdV26 nakuplja u kasnim lizosomima zbog njegove kolokalizacije s LAMP1 i to u razdoblju 2-8 h nakon infekcije. Pritom HAdV26 potiče urođenu imunost aktivacijom inflammasoma (Teigler i sur., 2014).

S obzirom da je seroprevalencija najbolje istraženog HAdV5 visoka u većini ispitivanih područja i varira od 50% do 90% ispitane populacije (Nwanegbo i sur., 2004; Hoolterman i sur., 2004), postojeća imunost može ograničiti njegovu primjenu. Zbog toga se razvija pristup u kojem se koriste niskoseroprevalentni HAdV kao vektori. Tako su vektori temeljeni na niskoseroprevalentnom HAdV26 ispitivani kao vektorske vakcine budući HAdV26 izaziva jaki imunski odgovor i stanične i humoralne imunosti u ljudi, može se koristiti opetovano te je pokazano da samo jedna intramuskularna doza HAdV26 vektorske vakcine protiv HIV izaziva sistemski i mukozni odgovor imunosti u ljudi bez upale sluznice (Abbink i sur., 2007; Baden i sur., 2015; Milligan i sur., 2016; Baden i sur., 2013; Barouch i sur., 2018). Zbog svoje sigurnosti i povoljne imunogeničnosti se vektorske vakcine temeljene na HAdV26 nalaze u oko 30 kliničkih ispitivanja (<https://clinicaltrials.gov/>), pri čemu je vakcina protiv SARS-CoV-2 u III. fazi

ispitivanja (WHO, 2020). Vakcina protiv Ebole je prva vakcina temeljena na HAdV26 odobrena za upotrebu u Europskoj Uniji (EMA, 2020). Osim toga, HAdV26 je nedavno pokazan kao obećavajući kandidat za terapijsku vakcinu za aktivnu imunoterapiju HPV (papiloma virus čovjeka) infekcije (Khan i sur., 2017).

1.7. Endocitoza

Endocitoza je opći pojam za unos izvanstaničnog materijala kao što su tekućina, otopljene tvari, makromolekule, komponente stanične membrane i druge čestice, u stanicu uvrnućem stanične membrane. Ujedno, putem endocitoze sve stanice u tijelu komuniciraju s biološkim okolišem. Ovaj proces je ovisan o energiji (Canton i Battaglia, 2012). Prema veličini materijala koji se unosi u stanicu, endocitoza se uobičajeno dijeli na fagocitozu koja podrazumijeva unos velikih krutih čestica uz prethodnu adheziju ($> 0.5 \mu\text{m}$) i na pinocitozu za unos manjih čestica u tekućini. Dok je fagocitoza ili „stanično hranjenje“ specifična samo za određene tipove stanica, tzv. profesionalne fagocite (neutrofili, makrofagi, monociti, dendritičke stanice, osteoklasti i eozinofili), pinocitoza ili „stanično pijenje“ je univerzalna za sve eukariotske stanice (Akinc i Battaglia, 2013). Pinocitoza se dijeli na makropinocitozu i receptor-posredovane endocitoze, ovisno o veličini endosomalnog mjehurića te uključenosti pojedinih tipova proteina i lipida (Canton i Battaglia, 2012).

Makropinocitoza uključuje nespecifičan unos izvanstaničnog materijala u mjehurićima naziva makropinosomi, čija veličina varira između 0.2 i $10 \mu\text{m}$ (Palm, 2019). Tijekom makropinocitoze potaknute faktorima rasta dolazi do polimerizacije aktina i remodeliranja stanične membrane u ispupčenja koja formiraju makropinosom. Makropinocitoza je neovisna o dinaminu-2, proteinu koji ima ulogu u odvajanju endocitoznog mjehurića od stanične membrane, a glavni faktori regulacije makropinocitoze su PAK-1, Arf6 te faktori Rho obitelji GTPaza: Rac1 i Cdc42 (Mercer i Helenius, 2009).

Kod receptor-posredovane endocitoze, vezanje liganda na određeni receptor pokreće promjenu konformacije i uvrnuće membrane kojom se formira endosom. Receptor-posredovane endocitoze su endocitoze posredovane klatrinom, kaveolinom, lipidnim splavima, Arf6, flotilinom, IL-2, CLIC/GEEC endocitoza i druge (Canton i Battaglia, 2012, Mayor i sur., 2014).

Klatrinom posredovana endocitoza smatra se najvažnijim tipom endocitoze eukariotske stanice za unos nutrijenata i prijenos signala putem receptora (Kaksonen i Roux, 2018). Također, klatrinom posredovana endocitoza je učestali tip endocitoze za ulazak virusa u stanice (Mercer i sur., 2010; Meier i Greber, 2004). Nakon vezanja liganda na receptor dolazi do uvrnuća membrane i formiranja mjehurića koji se oblaže proteinom klatrinom nakon akumulacije fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata i nekog od adapterskih proteina kao što je AP2 (Popova i sur., 2013). Klatrin se veže na formirani mjehurić u obliku triskeliona koji sadrži tri teška lanca i tri laka lanca. Teški lanci pružaju strukturnu okosnicu triskeliona, a laki lanci reguliraju formiranje i rastavljanje rešetke klatrina oko mjehurića. Za formiranje klatrinom obloženog mjehurića uobičajene veličine 70-150 nm potrebna je reorganizacija aktina, a za odvajanje od stanične membrane nužna je defosforilacija fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata i aktivnost dinamina-2, nakon čega slijedi brza disocijacija klatrina (McMahon i Boucrot, 2011). Tako formirani mjehurić se dalje sortira i transportira do različitih odredišta, ovisno o receptoru i sastavu membrane (Canton i Battaglia, 2012; Popova i sur., 2013).

Kaveolinom posredovana endocitoza je proces koji se odvija na uvrnućima membrana bogatima kolesterolom i sfingolipidima naziva kaveole i uključena je u mnoge stanične i fiziološke procese kao što su unos nutrijenata, regulacija lipida, prijenos signala i slično (Pelkmans i sur., 2004). Kaveole imaju specifičan oblik boce, a grade ih proteini kaveolini i kavini. Postoje 3 tipa kaveolina: za formiranje kaveola najvažniji kaveolin-1, zatim kaveolin-2 i kaveolin-3 koji je specifično eksprimiran samo u mišićnim stanicama. Poznata su četiri različita kavina u sisavaca (kavin 1-4) (Hayer i sur., 2010). Za odvajanje kaveolinom obloženog mjehurića potrebna je aktivnost dinamina-2. Formirani mjehurić je uobičajeno veličine 60-80 nm i može se spojiti s drugim kaveolinom obloženim mjehurićima tvoreći kaveosome ili s ranim endosomima. Za razliku od klatrina, kaveolin ostaje vezan u endosomalnom mjehuriću nakon odvajanja od stanične membrane (Mayor i sur., 2014; Pelkmans i sur., 2004).

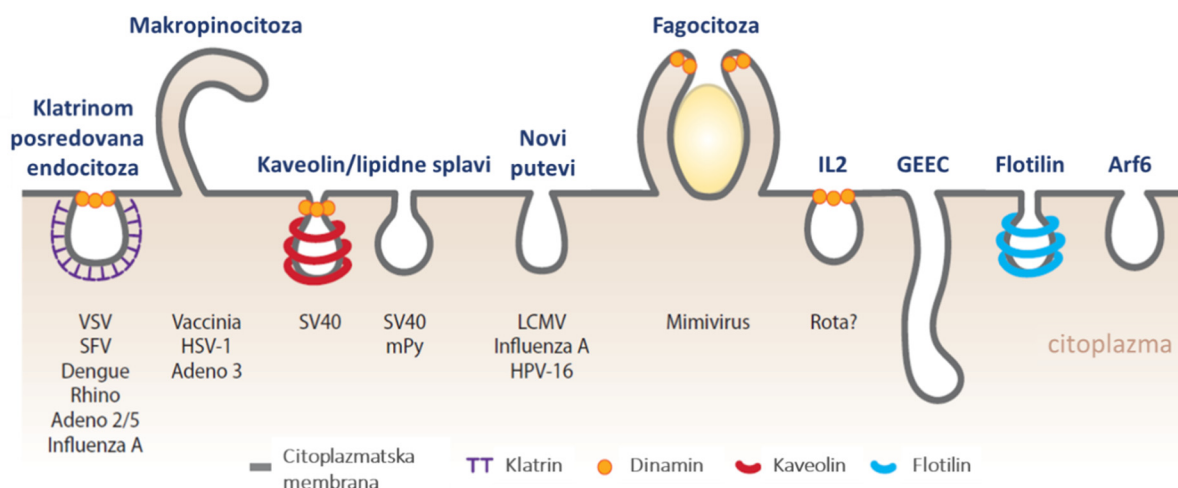
Od ostalih receptor-posredovanih endocitoza, IL-2 posredovana endocitoza ovisna je o dinaminu-2, dok su Arf6 i flotilinom posredovane endocitoze te CLIC/GEEC endocitoza neovisne o dinaminu-2 (Mercer i sur., 2010). Tipovi endocitoze u eukariotskim stanicama i njihovi stanični faktori prikazani su u Tablici 3.

Zanimljivo, do sad je pokazano da virusi mogu koristiti gotovo sve tipove endocitoze za ulazak u stanicu (Mercer i sur., 2010) (Slika 6).

Tablica 3. Tipovi endocitoze i stanični faktori koji ih reguliraju. (preuzeto i prilagođeno iz Mercer i sur., 2010)

| TIP ENDOCITOZE | Protein koji obavlja formirani endocitozni mjehurić | Faktor za odvajanje formiranog endocitoznog mjehurića | Regulator endocitoze | Komponenta citoskeleta uključena u endocitozu | Molekula uključena u unutarstanično putovanje |
|-------------------------------|--|---|--|---|--|
| KLATRINOM POSREDOVANA | klatrin – laki i teški lanac adapteri - AP2, eps15, epsin1 | dinamin-2 | PI(3,4)P, PI(4,5)P2, kolesterol, kortaktin, Arp2-3 | aktin, mikrotubuli | Rab5, Rab7, Rab4, Rab11, Rab22 |
| MAKROPINOCITOZA | / | nepoznato | tirozin kinaze, PAK1, PI(3)K, PKC, Ras, Rac1, Cdc42, Rab34, CtBP1, Na ⁺ /H ⁺ izmjena, kolesterol | aktin, mikrotubuli, miozin | Rab5, Rab7, Arf6 |
| KAVEOLINOM POSREDOVANA | kaveolin-1/2/3 | dinamin-2 | tirozin kinaze, fosfataze, PKC, RhoA, kolesterol | aktin, mikrotubuli | Rab5 |
| LIPIDNE SPLAVI | nema (klatrini kaveolin neovisno) | nepoznato (dinamin-2 neovisno) | tirozin kinaze, RhoA, kolesterol | aktin | nepoznato |
| IL-2 POSREDOVANA | nema | dinamin-2 | RhoA, lipidne splavi, ubikvitinacija | aktin | Rab5, Rab7 |
| GEEK | nepoznato, GRAF1 | nepoznato (dinamin-2 neovisno) | Arf1, ARHGAP10, Cdc42, lipidne splavi | aktin | Rab5, PI(3)K |
| FLOTILINOM POSREDOVANA | flotilin-1 | nepoznato (dinamin-2 neovisno) | Fyn kinaza, lipidne splavi | nepoznato | Rab5, PI(3)K |
| ARF6 POSREDOVANA | nema | nepoznato (dinamin neovisno) | PIP5K, Arf6, Arf1, PI(4,5)P, PI(3)K, kolesterol, aktin | aktin | Rab5, Rab7 (degradacija), Rab11, Rab22 (samo recikliranje) |
| FAGOCITOZA | nema (ovisi o čestici) adapter – AP2 | dinamin-2 | tirozin kinaze, PI(3)K, PKC, Ras, RhoA, RhoG, Rac1, Cdc42, Arf6, kolesterol | aktin, mikrotubuli, miozin | Rab5, Rab7 |

Endosomi su membranom odvojeni mjehurići nastali uvrnućem i odvajanjem od stanične membrane, dio su transportnog sustava u stanici, a sudjeluju u regulaciji sadržaja proteina i lipida u membranama, sortiranjem, preradom, recikliranjem, aktiviranjem i razgradnjom nutrijenata unešenih endocitozom te regulacijom brojnih puteva u stanici (Mercer i sur., 2010; Huotari i Helenius, 2011). Tipovi endosoma prikazani su u Tablici 4.



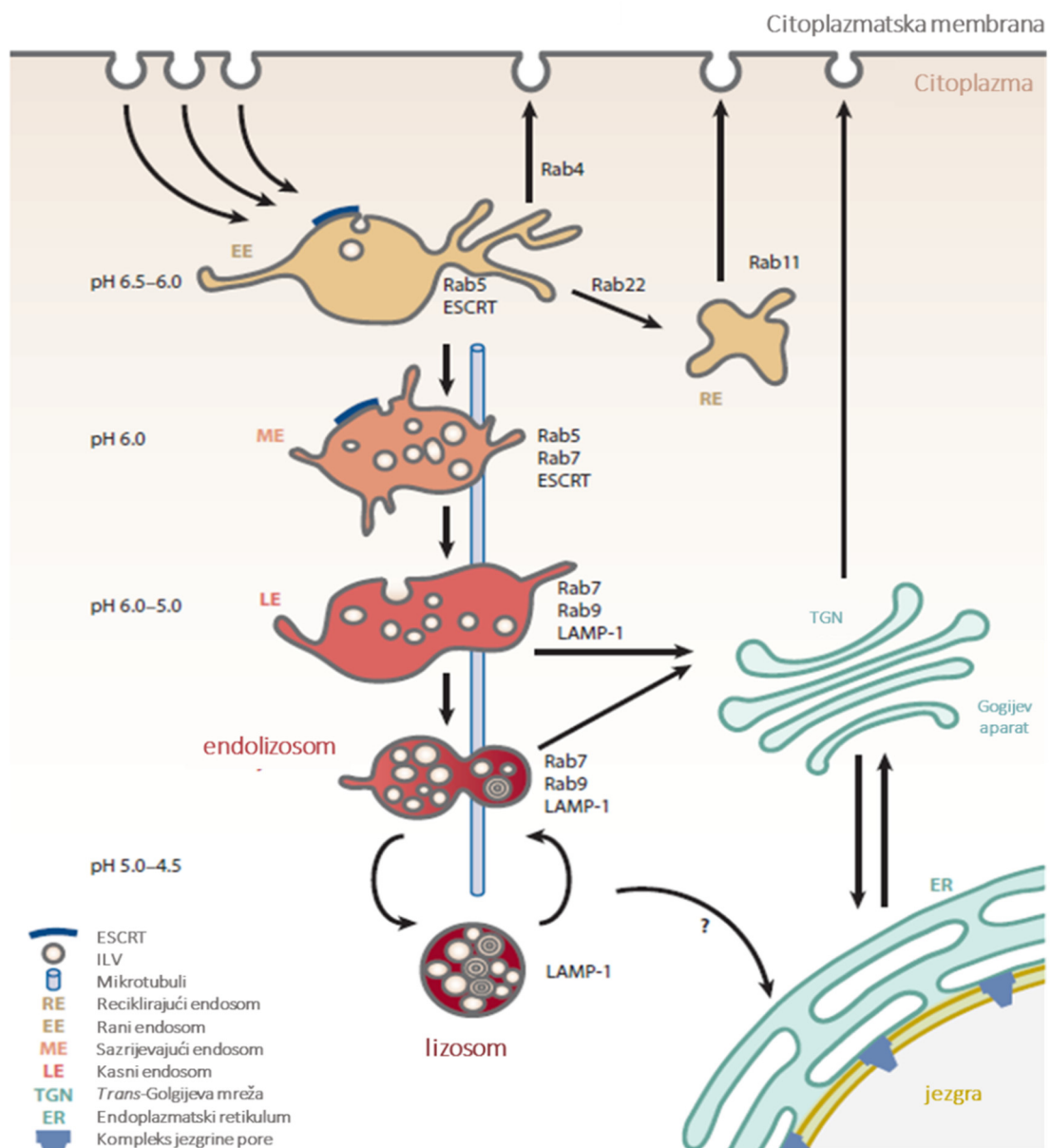
Slika 6. Tipovi endocitoze koje virusi koriste za ulazak u stanice čovjeka. Velike čestice u stanicu se unose putem fagocitoze, dok se manje čestice unose ostalim tipovima endocitoze, kao što su endocitoze posredovane klatrinom, kaveolinom, lipidnim splavima, IL-2, GEEC, flotilinom i Arf6, te neki novi tipovi endocitoze. Za mnoge od njih važan je protein dinamin koji odvaja nastali endocitozni mjehurić od citoplazmatske membrane, a kod nekih tipova endocitoze mjehurić je obavijen specifičnim proteinom. Kratice: VSV – virus vezikularnog stomatitisa, SFV – Semliki šumski virus, Dengue – Dengue virus, Rhino – rinovirus, Adeno 2/5 – adenovirusi čovjeka serotipa 2 i 5, Influenza A – virus gripe tipa A, HSV-1 – herpes simpleks virus 1, Adeno 3 – adenovirus čovjeka serotipa 3, SV40 – Simian virus 40, pPy – mišji poliovirus virus, LCMV – virus limfocitnog koriomeningitisa, HPV-16 – papiloma virus čovjeka tipa 16, Rota – rotavirus. (preuzeto i prilagođeno iz Mercer i sur., 2010).

Tablica 4. Podjela endosoma prema specifičnim proteinskim biljezima, pH vrijednosti unutar endosoma i ulozi. Rab proteini, pripadnici Ras superobitelji GTPaza, su glavni biljezi koji definiraju identitet pojedinog endosoma i tijekom sazrijevanja endosoma mijenja se njihov sastav. Drugi karakteristični proteinski biljezi su rani endosomalni antigen 1 (engl. *Early Endosomal Antigen 1*, EEA1) te membranski protein 1 povezan s lizosomom (engl. *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*, LAMP-1) (Mercer i sur., 2010; Huotari i Helenius, 2011; Langemeyer i sur., 2018).

| Tip endosoma | Proteinski biljeg | pH | Uloga |
|--|-------------------|---------|--|
| rani endosomi engl. <i>early endosomes</i> EE | EEA1, Rab5 | 6.0-6.8 | prihvatanje i sortiranje molekula unešenih endocitozom |
| reciklirajući endosomi engl. <i>recycling endosomes</i> RE | Rab11, Rab8 | 6.4-6.5 | recikliranje unešenih molekula natrag na citoplazmatsku membranu |
| sazrijevajući endosomi engl. <i>maturing endosomes</i> ME | Rab 5, Rab7 | 6.0 | prijelazni oblik između EE i LE, sadrže biljege i EE i LE |
| kasni endosomi engl. <i>late endosomes</i> LE | Rab7, Rab9, LAMP1 | 4.8-6.0 | stapaju se ili međusobno pa zatim s <i>trans</i> -Golgijevom mrežom ili s lizosomima |
| lizosom | LAMP1 | 4.5-5.0 | razgradnja tvari unešenih endocitozom |

Endosomi se neprestano mijenjaju i sazrijevaju prelazeći iz jednog oblika u drugi što uključuje izmjenu proteina na membranama endosoma, pad pH vrijednosti unutar

lumena endosoma, njihovo pomicanje u perinuklearno područje, promjenu morfologije, stjecanje lizosomskih komponenata, pomak u izboru partnera za fuziju te otpuštanje dodatnih vezikula unutar lumena endosoma (Mercer i sur., 2010) (Slika 7). Sazrijevanje endosoma je vrlo koordinirano i regulirano je brojnim čimbenicima. pH vrijednost lumena endosoma je u kiselom području, a zakiseljavanje i njegova regulacija čine važan dio sazrijevanja endosoma (Huotari i Helenius, 2011). EE se obično nalaze u blizini citoplazmatske membrane dok su LE uglavnom smješteni u perinuklearnom prostoru stanice (Nielsen i sur., 1999; Hoepfner i sur., 2005; Huotari i Helenius, 2011).



Slika 7. Shematski prikaz mreže endosoma. Sazrijevanje endosoma praćeno je snižavanjem pH vrijednosti u lumenu endosoma te izmjenom proteinskih biljega. ESCRT – endosomski kompleksi za sortiranje potrebni za transport (engl. *endosomal sorting complexes required for transport*), ILV- vezikule unutar lumena endosoma (engl. *intraluminal vesicles*). (preuzeto i prilagođeno iz Mercer i sur., 2010)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni nedostatak HAdV5 iz podgrupe C adenovirusa, na temelju kojeg je konstruiran najčešće korišteni adenoviralni vektor za gensku terapiju i vakcinaciju, jest njegova visoka seroprevalencija u populaciji koja može ograničiti učinkovitost vektora. Stoga je potrebno razviti nove strategije za izbjegavanje neželjenog imunskog odgovora domaćina. Jedan od načina je korištenje onih tipova adenovirusa koji se u populaciji ljudi javljaju u niskoj seroprevalenciji kao što je HAdV26 iz podgrupe D adenovirusa. Većina istraživanja s HAdV26 je dosad rađena uglavnom *in vivo* tako da je imunogeničnost HAdV26 dobro opisana. Stoga su vektori temeljeni na HAdV26 proučavani kao vektorske vakcine jer uzrokuju povoljni stanični i humoralni odgovor stečene imunosti te se mogu opetovano koristiti. Međutim, podaci vezani uz osnovnu biologiju HAdV26 su skromni pa se tako npr. ne zna koji je primarni receptor HAdV26 niti na koji način ovaj virus ulazi u ciljnu stanicu.

U skladu s navedenim, glavni cilj ove doktorske disertacije je istražiti način na koji HAdV26 inficira stanice epitela čovjeka. Specifični ciljevi istraživanja su, koristeći model stanica epitela čovjeka, identificirati receptor za HAdV26, odrediti ulogu receptora u ulasku HAdV26, ispitati uključenost pojedinih tipova endocitoze u ulazak HAdV26, istražiti unutarstanično putovanje HAdV26 te istražiti urođeni imunski odgovor epitelne stanice potaknut infekcijom s HAdV26.

Prethodno je pokazan značajan utjecaj αv integrina na uspješnost transdukcije s HAdV26. Kako je poznato da različiti tipovi adenovirusa uslijed vezanja za različite receptore pokazuju i različiti ulazak i unutarstanično putovanje u stanicama čovjeka, hipoteza je da HAdV26 za infekciju stanica epitela čovjeka koristi receptore različite od CAR i CD46, što posljedično mijenja i način na koji će HAdV26 ući u stanice i koji je različit od HAdV5 i HAdV35. Uslijed različitog načina ulaska i unutarstaničnog putovanja, hipoteza je da HAdV26 uzrokuje i drugačiji urođeni imunski odgovor stanica epitela čovjeka u odnosu na HAdV5 i HAdV35.

Dobiveni rezultati pružit će informacije o osnovnoj biologiji HAdV26, ali i omogućiti razvoj učinkovitijeg i sigurnijeg vektora temeljenog na HAdV26 za upotrebu u genskoj terapiji i vakcinaciji.

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u Tablici 5.

Tablica 5. Osnovne kemikalije korištene u radu.

| Kemikalija | Proizvođač | Kemikalija | Proizvođač |
|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
| agaroza | Sigma-Aldrich, Njemačka | akrilamid | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Alexa Fluor 5-TFP | Thermo Fisher Scientific, SAD | amidocrno | Kemika, Hrvatska |
| amonijev klorid (NH ₄ Cl) | Sigma-Aldrich, Njemačka | amonijev persulfat, APS | Serva, Njemačka |
| beta-merkaptetanol | Fluka, Njemačka | bisakrilamid | Serva, Njemačka |
| bromfenolno plavilo (engl. <i>bromophenol blue</i>) | Serva, Njemačka | BSA (albumin seruma goveda; engl. <i>bovine serum albumine</i>) | Carl Roth, Njemačka |
| cezijev klorid (CsCl ₂) | Sigma-Aldrich, Njemačka | DAPI Fluoromount G | Southern Biotech, SAD |
| deionizirana voda (diH ₂ O) | | DMEM (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| DMSO (dimetilsulfoksid) | Sigma-Aldrich, Njemačka | EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina) | Kemika, Hrvatska |
| etanol | GramMol, Hrvatska | etidij-bromid (EtBr) | Serva, Njemačka |
| FACSFlow | BD Biosciences, SAD | faloidin (Phalloidin Alexa Fluor 555) | Cell Signaling |
| fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline, PBS</i>) | Sigma-Aldrich, SAD | fosfatni pufer bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺ (PBSΔ) | Sigma-Aldrich, SAD |
| geneticin (G418 Sulfate) | Calbiochem, SAD | glicerol | Kemika, Hrvatska |
| IsoFlow Sheat Fluid | Beckman Coulter, SAD | Lipofectamine RNAiMAX | Invitrogen, SAD |
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen, SAD | McCoy hranjiva podloga | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| medij za uklapanje Mowiol | Sigma-Aldrich, SAD | mlijeko u prahu, nemasno | Carl Roth, Njemačka |
| MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)) | Sigma-Aldrich, SAD | Opti-MEM (engl. <i>minimum essential media</i>) | Gibco, SAD |
| Orange G | Merck Milipore, Njemačka | paraformaldehid (PFA) | Merck Milipore, Njemačka |
| <i>Pierce ECL Western Blotting Substrate</i> | Thermo Fisher Scientific, SAD | puromicin | Sigma-Aldrich, SAD |
| SDS (natrij-dodecil sulfat) | Sigma-Aldrich, SAD | serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum, FBS</i>) | Sigma-Aldrich, SAD |
| standard za elektroforezu u gelu | Thermo Fisher Scientific, SAD | standard (engl. <i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>) | Thermo Fisher Scientific, SAD |

| | | | |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| <i>SYBR Green</i> | Applied Biosystems, SAD | <i>SYBR Green ROX qPCR Mastermix</i> | Qiagen, Njemačka |
| TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiamin) | Sigma-Aldrich, SAD | trypsin-EDTA | Sigma-Aldrich, SAD |
| tris baza | Sigma-Aldrich, SAD | Tris-HCl | Merck Millipore, Njemačka |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, SAD | Tween-20 | Sigma-Aldrich, SAD |

3.1.2. Pufferi i otopine

Osnovne otopine i pufferi te načini njihove pripreme navedeni su u Tablici 6.

Tablica 6. Osnovne otopine i pufferi korišteni u radu.

| Otopina | Priprema |
|--|---|
| PFA _{4%} /PBS | 10 g PFA i 100 µL NaOH otopi se u 1000 mL PBS, čuva se pri -20°C |
| PFA _{2%} /PBS | PFA _{4%} /PBS u PBS u omjeru 1:1 |
| PFA _{1%} /PBS | PFA _{4%} /PBS u PBS u omjeru 1:3 |
| AF1 pufer | 10% glicerola u 100 nM NaHCO ₃ u PBS, pH 7.2 |
| Pufer TAE (50x) | 242 g Tris baza, 57.1 mL ledene octene kiseline, 100 mL 0.5 M, pH 8.0, otopiti u 1 L diH ₂ O |
| Pufer TD | 8 g NaCl i 0.38 g KCl otopi se u 150 mL diH ₂ O, doda se 0.1 g Na ₂ HPO ₄ i 3 g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH ₂ O, podesi pH 7.4-7.5, nadopuni do 1 L s diH ₂ O; sterilizira se autoklaviranjem |
| Pufer za nanošenje uzoraka DNA u gel agaroze (6x): | 50% glicerol, 20 mM EDTA, 0,25% Orange G boja |
| Otopina CsCl gustoće 1,25 g/mL | 36,16 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera |
| Otopina CsCl gustoće 1,34 g/mL | 51,20 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera |
| Otopina CsCl gustoće 1,40 g/mL | 62,00 g CsCl otopi se u 100 mL TD pufera |
| DMEM-FBS _{10%} | 500 mL FBS u 5000 mL DMEM |
| DMEM-FBS _{0.2%} | 10 mL FBS u 5000 mL DMEM |
| McCoy-FBS _{10%} | 500 mL FBS u 5000 mL McCoy |
| PBSΔ-3% BSA | 0.3 mg BSA otopi se u 10 mL PBSΔ, čuva se pri 4°C |
| PBSΔ-5% BSA | 0.5 mg BSA otopi se u 10 mL PBSΔ, čuva se pri 4°C |
| 10x TBS | 500 mL Tris-HCl (pH 7,5) + 300 mL 5 M NaCl + 200 mL diH ₂ O, čuva se pri 4°C |
| Pufer TBST | 50 mL pufera 10x TBS + 450 mL diH ₂ O + 450 µL Tween-20 |
| akrilamid/bisakrilamid 30% | 29,2 g akrilamida i 0.8 g bisakrilamida otopi se u 100 mL diH ₂ O |
| APS, 10% | 500 mg APS-a otapa se u 5 mL diH ₂ O, čuva se pri -20°C |
| 6X SB pufer (engl. <i>sample buffer</i> ; za SDS-PAGE) | 1.2 g SDS otopi se u 2 mL diH ₂ O, doda se 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 6.8 i 30 mg Bromfenol plavila, nakon što se otopi doda se 3 mL glicerola i 1.2 mL β-merkptoetanol. Dopuni se do 10 mL diH ₂ O i čuva pri -20°C |
| amidocrno boja, 0,1% | 45 mL metanola, 10 mL octene kiseline, 45 mL vode, 0,1 g amidocrno otopine u 100 mL |
| Pufer PS | 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS |
| Otopina za odbojavanje | 40 mL metanola, 7 mL octene kiseline, 53 mL vode |
| Pufer Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M) | 6 g Tris-HCl otopi se u 80 mL diH ₂ O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, nadopuni se diH ₂ O do 100 mL, čuva se pri 4°C |
| Pufer Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M) | 18.2 g Tris-HCl otopi se u 100 mL diH ₂ O, podesi se pH dodatkom 6 M HCl, čuva se pri 4°C |
| Pufer Tris-glicin | 24 g Tris baza, 114 g glicina, 10 g SDS, pH 8.3 |

3.1.3. Stanične linije

U ovom radu korištene su komercijalno dostupne stanične linije iz *American Type Culture Collection* (ATCC, SAD) i uzgajane su u uvjetima rasta kako je preporučeno od dobavljača: A549 (ATCC CCL-185), SK-OV-3 (ATCC HTB-77), MDA-MB-435S (ATCC HTB-129D), HEp2 (ATCC CCL-23), RD (ATCC CCL-136), HEK-293 (ATCC CRL-1573). HEp2-K klonovi (HEp2-K1, HEp2-K4, HEp2-K9) te 3av klon prethodno su konstruirani u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala (Ambriović-Ristov i sur., 2004; Paradžik i sur., 2020). Stanična linija A549 korištena je za transfekciju i izdvajanje stabilno transficiranih klonova stanica (A549- α v, A549- β 3, A549-shCLTC, A549-shCAV-1).

3.1.4. Replikacijski defektni adenoviralni vektori

Adenoviralni vektori prethodno su konstruirani (Abbink i sur., 2007) i dobiveni su ljubaznošću dr. sc. Jeromea Custersa (Janssen Vaccines & Prevention B.V., Leiden, Nizozemska). U radu su korišteni sljedeći adenoviralni vektori: HAdV5, HAdV26, HAdV35. Svi adenoviralni vektori su replikacijski defektni i kao transgen imaju zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP). Vektori su umnoženi u HEK-293 stanicama i pročišćeni centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu cezijeveog klorida.

3.1.5. Kompleti kemikalija i standardi

Korišteni kompleti navedeni su u Tablici 7.

Tablica 7. Korišteni kompleti.

| Komplet | Kataloški broj | Proizvođač |
|---|----------------|-------------------------|
| QIAamp DNA Blood Mini Kit | 51104 | Qiagen, Njemačka |
| High Pure RNA Isolation Kit | 11828665001 | Roche, SAD |
| <i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i> | 4368814 | Applied Biosystems, SAD |
| Human IL-1 β Ready-SET-Go! | 88-7261-88 | Invitrogen, SAD |
| Human IL-6 Uncoated ELISA | 88-7066-88 | Invitrogen, SAD |
| Human IL-8 Uncoated ELISA | 88-8086-88 | Invitrogen, SAD |
| RT ² PCR Profiler Array PAHS-097ZC | 330500 | Qiagen, Njemačka |

3.1.6. Protutijela

Korištena protutijela navedena su u Tablici 8.

Tablica 8. Korištena protutijela.

| Protutijelo | Proizvedeno u organizmu | Koncentracija | Razrjeđenje | Kataloški broj | Proizvođač |
|--|-------------------------|---------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------|
| Primarna protutijela | | | | | |
| izotipska kontrola IgG | miš | 0.5 mg/mL | 1:50 | M5284 | Sigma-Aldrich, SAD |
| $\alpha\beta 3$ integrin | miš | 1 mg/mL | 1:100 | MAB1976 LM609 | Merck Millipore, Njemačka |
| $\alpha\beta 5$ integrin | miš | 1 mg/mL | 1:100 | MAB1961 P1F6 | Merck Millipore, Njemačka |
| $\alpha\upsilon$ integrin | miš | 0.5 mg/mL | 1:100 | 407286 272-17E6 | Merck Millipore, Njemačka |
| $\alpha\upsilon\beta 6$ integrin | miš | 1 mg/mL | 1:100 | MAB2074Z E7P6 | Merck Millipore, Njemačka |
| $\beta 1$ integrin | miš | 1 mg/mL | 1:100 | MAB1965 JB1A | Merck Millipore, Njemačka |
| CAR | miš | 1 mg/mL | 1:100 | 05-644 RcmB | Merck Millipore, Njemačka |
| CD46 | miš | 1 mg/mL | 1:100 | MCA2113 | BioRad, SAD |
| klatrin (CLTC) | zec | 1 mg/mL | 1:250 za IF* 1:1000 za WB* | ab21679 | Abcam, UK |
| kaveolin-1 (CAV-1) | zec | 1 mg/mL | 1:250 za IF* 1:1000 za WB* | ab2910 | Abcam, UK |
| dinamin-2 (DNM2) | zec | 1 mg/mL | 1:250 | ab3457 | Abcam, UK |
| EEA1 | zec | 1 mg/mL | 1:100 | #2411 | Cell Signaling, SAD |
| LAMP1 | zec | 1 mg/mL | 1:250 | ab24170 | Abcam, UK |
| Golgijevo tijelo | zec | 1 mg/mL | 1:2500 | #12480 | Cell Signaling, SAD |
| Sekundarna protutijela | | | | | |
| protu-miš IgG obilježeno s FITC | koza | 0.5 mg/mL | 1:50 | 554001 | BD Biosciences, SAD |
| protu-zec IgG obilježeno s Alexa Fluor 647 | koza | 2 mg/mL | 1:1000 | 4414S | Cell Signaling, SAD |
| protu-miš obilježeno s Alexa Fluor 546 | koza | 2 mg/mL | 1:1000 | A11030 | Invitrogen, SAD |
| *IF – korišteno za analizu unutarstaničnog putovanja praćeno konfokalnom mikroskopijom | | | | | |
| *WB – korišteno za analizu ekspresije proteina metodom western blot | | | | | |

3.1.7. Kemijski inhibitori endocitoze

Korišteni kemijski inhibitori endocitoze navedeni su u Tablici 9. Pripremljene su otopine otapanjem liofiliziranih inhibitora u DMSO. Otopine su čuvane pri -20°C. Finalne koncentracije korištenih spojeva dobivene su otapanjem u hranjivoj podlozi DMEM-FBS_{0.2%}.

Tablica 9. Korišteni kemijski inhibitori endocitoze.

| Inhibitor | Pripremljeni u koncentraciji | Finalna koncentracija | Kataloški broj | Proizvođač |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------|--------------------|
| pitstop 2 | 30 mM | 20 µM | ab120687 | Abcam, UK |
| filipin III | 5 mg/mL | 5 µg/mL | F4767 | Sigma-Aldrich, SAD |
| dyngo 4a | 100 mM | 25 µM | ab120689 | Abcam, UK |
| dynasore | 100 mM | 200 µM | D7693 | Sigma-Aldrich, SAD |
| cytochalasin D | 5 mM | 1 µM | C8273 | Sigma-Aldrich, SAD |

3.1.8. Početnice

Korištene početnice navedene su u Tablici 10. Pripremljene su otopine početnica otapanjem liofiliziranih početnica u diH₂O bez nukleaza u koncentraciji 100 µM. Radne otopine početnica pripremljene su daljnjim razrjeđivanjem u diH₂O bez nukleaza do konačne koncentracije od 10 µM. Otopine početnica su čuvane pri -20°C.

Tablica 10. Korištene početnice.

| Početnice za gen | Slijed nukleotida u smjeru 5' – 3' |
|------------------|---|
| IL-6 | F: CAATGAGGAGACTTGCCTGG R: GCACAGCTCTGGCTTGTCC |
| IL-8 | F: GTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTC R: ATGAAGTGTTGAAGTAGATTTGCTTG |
| IL-1β | F: TGGCAATGAGGATGACTTGTTCC R: CTGTAGTGGTGGTCGGAGATT |
| IL-18 | F: GACTGTAGAGATAATGCAC R: CTTCGTTTTGAACAGTGAAC |
| CMV | F: TGGGCGGTAGGCGTGTA R: CGATCTGACGGTTCACTAAACG |
| GAPDH | F: AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG R: TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA |

3.1.9. Male interferirajuće RNA (siRNA)

Korištene male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) navedene su u Tablici 11. Pripremljene su otopine siRNA otapanjem liofiliziranih siRNA u diH₂O u koncentraciji 100 µM. Radne otopine siRNA pripremljene su daljnjim razrjeđivanjem diH₂O do konačne koncentracije od 10 µM. Otopine siRNA su čuvane pri -20°C.

Tablica 11. Korištene siRNA molekule.

| siRNA | ID broj | Proizvođač |
|--|---------|-------------|
| CAV1 | s2446 | Ambion, SAD |
| CLTC | s477 | Ambion, SAD |
| DNM2 | s4212 | Ambion, SAD |
| negativna kontrola (<i>Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA</i>) | 4390844 | Ambion, SAD |

3.1.10. Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali

Korišteni uređaji navedeni su u Tablici 12., a laboratorijski pribor i ostali materijali u Tablici 13.

Tablica 12. Korišteni uređaji.

| Uređaj | Proizvođač |
|---|--------------------------------|
| analitička vaga AB54-S | Mettler Toledo Classic |
| brojač stanica Coulter Counter | Beckman Coulter, SAD |
| centrifuga za mikroprevute (do 14000 × g) | Eppendorf, Njemačka |
| centrifuga za stanice (do 12568 × g) Labofuge 400 | Heraeus, Njemačka |
| inkubator za uzgoj kulture stanica | Heraeus, Njemačka |
| Invertni svjetlosni mikroskop | Opton, Njemačka |
| izvor napajanja za elektroforezu proteina i transfer PowerPac Basic | BioRad, SAD |
| kabinet za rad u sterilnim uvjetima | Klimaoprema, Hrvatska |
| kadica za elektroforezu i transfer proteina | BioRad, SAD |
| konfokalni mikroskop Leica TCS SP8 X | Leica Microsystems, Njemačka |
| kupelj JB Nova | Grant Instruments, UK |
| magnetska miješalica | Tehnica, Slovenija |
| nanodrop | Thermo Fischer Scientific, SAD |
| pH metar PH3 Sension+ | Hach, SAD |
| protočni citometar FACSCalibur | BD Biosciences, SAD |
| spektrofotometar StatFax 2100 | Awareness Technology INC, SAD |
| spremnik za tekući dušik 35VHC | Taylor-Wharton, SAD |
| termoblok Thermomixer compact | Eppendorf, Njemačka |
| tresilica za pločice Vibromix 301EVT | Tehnica, Slovenija |
| ultracentrifuga optima XL-100K | Beckman, SAD |

| | |
|--|--------------------------------|
| uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom Ultrasonic Processor | ColeParmer, SAD |
| uređaj za <i>Real-Time</i> PCR StepOnePlus™ Real-Time PCR System | Thermo Fischer Scientific, SAD |
| uređaj za vizualizaciju gelova s DNA Transiluminator TCX20M | Vilber, Njemačka |
| uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala ChemiDoc Imaging System | BioRad, SAD |
| vorteks EV 102 | Tehtnica, Slovenija |
| zibalica Vibromix 314 EVT | Tehtnica, Slovenija |

Tablica 13. Korišteni laboratorijski pribor i drugi materijali.

| Pribor/materijali | Proizvođač |
|--|-------------------------------------|
| ampule za smrzavanje stanica | Nunc, Danska |
| aparatura za izlivanje gela i za vertikalnu elektroforezu proteina Mini-PROTEAN® <i>Tetra Cell Systems</i> | BioRad, SAD |
| automatska pipeta | Integra Biosciences, SAD |
| epruvete za centrifugiranje Ultra-Clear 344059 | Beckman, SAD |
| gumena strugalica (engl. <i>policeman</i>) | Falcon Becton Dickinson, SAD |
| Hamilton igla | Hamilton, Švicarska |
| kolona Sephadex G25M | GE Healthcare Life Sciences, UK |
| kolone Zeba Spin Desalting Columns 7K MWCO | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| mikroepruvete | Eppendorf, Njemačka |
| nastavci za mikropipete s filtrom i bez filtra | Eppendorf, Njemačka |
| nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm | Amersham Pharmacia Biotech, Švedska |
| pločice MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, N8010560 | Applied biosystems, SAD |
| posude za uzgoj kulture stanica svih formata | Falcon Becton Dickinson, SAD |
| stakalca za konfokalni mikroskop | Vitrognost, Hrvatska |

3.1.11. Računalni programi

Računalni programi korišteni u radu navedeni su u Tablici 14.

Tablica 14. Korišteni računalni programi

| Ime računalnog programa | Verzija | Izdavač |
|--|----------------|------------------------------------|
| Leica Application Suite (LAS) X | 3.3.0.16799 | Leica Microsystems, Njemačka |
| Image J | 1.52.i | National Institutes of Health, SAD |
| FCS Express Flow Cytometry Data Analysis | 3 | De Novo Software, SAD |
| Microsoft Office Professional Plus 2016 | 14.0.4266.1001 | Microsoft Office, SAD |
| GraphPad Prism | 6.01 | GraphPad Software, SAD |

3.2. METODE

U ovom radu su korištene standardne metode molekularne biologije koje su detaljno opisane u priručniku "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.2.1. Uzgoj staničnih linija

Sve stanične linije korištene u ovom radu su adherente, što znači da rastu pričvršćene za dno posude u kojoj rastu. Stanice rastu u hranjivoj podlozi u inkubatoru za uzgoj kulture stanica u kojem se održavaju stalna temperatura zraka pri 37°C, udio CO₂ od 5% u smjesi zraka te je atmosfera zasićena vlagom. SK-OV-3 stanična linija je uzgajana u McCoy-FBS_{10%} hranjivoj podlozi, dok su sve ostale stanične linije uzgajane u DMEM-FBS_{10%} hranjivoj podlozi. Stanice se smrzavaju s ciljem dugotrajnog čuvanja staničnih linija. Suspenzija stanica se nakon odvajanja od podloge centrifugira 10 min pri 1000 x g, supernatant se uklanja, a talog stanica se resuspendira u hranjivoj podlozi uz dodatak DMSO (5% volumnog udjela) te se stanice prebace u ampulu za smrzavanje. Ampula se stavlja prvo na led i nakon 30 min se prebaci na prsten spremnika s tekućim dušikom gdje se stanice smrzavaju u parama tekućeg dušika, a sljedeći dan se ampule stavljaju u tekući dušik pri -196°C.

Stanice se odmrzavaju uranjanjem ampule u vodenu kupelj zagrijanu pri 37°C nakon čega se resuspendiraju u prethodno zagrijanoj hranjivoj podlozi (37°C) i prebace u posudu za uzgoj stanične kulture. Stanicama se 24 h nakon odmrzavanja promijeni hranjiva podloga kako bi se iz hranjive podloge u potpunosti uklonio DMSO iz podloge za smrzavanje koji može imati toksično djelovanje na stanice. Prije nego prerastu površinu za rast ili iscrpe sastojke hranjive podloge stanice se presade u nove posude za uzgoj stanične kulture. Uklanja se hranjiva podloga sa stanica i stanice se ispiru dva puta s PBSΔ, nakon čega se dodaje tripsin da bi se stanice odvojile od podloge za rast. Odvajanje stanica od podloge je praćeno svjetlosnim mikroskopom. Djelovanje tripsina je zaustavljeno dodatkom hranjive podloge, nakon čega se stanice resuspendiraju i nasade u nove posude za uzgoj stanica.

3.2.2. Umnažanje i pročišćavanje adenoviralnih vektora centrifugiranjem u cezijevoj kloridu

Za umnažanje replikacijski defektnih adenoviralnih vektora koriste se HEK-293 stanice koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenoviralnog genoma. Za svaku preparaciju adenoviralnih vektora HEK-293 stanice su namnožene u 120 (kod HAdV26) ili 40 (kod HAdV5 i HAdV35) Petrijevih zdjelica promjera 10 cm i inficirane suspenzijom adenoviralnih vektora tako da je multiplicitet infekcije 5-10 PFU (engl. *plaque forming unit*) po stanici. Inficirane stanice se stavljaju u inkubator za uzgoj kulture stanica do postignuća potpunog citopatogenog učinka kao posljedice infekcije s adenoviralnim vektorom (najčešće 48 do 72 h nakon infekcije). Stanice se odvajaju od podloge pipetiranjem te se zajedno s hranjivom podlogom skupe u epruvetu i centrifugiraju tijekom 10 min pri 1100 x g. Ukupni talog stanica se resuspendira u 10 mL podloge DMEM-FBS_{10%} i nakon toga se tri puta smrzava (-80°C) i odmrzava (37°C) u svrhu lize stanica kako bi se adenoviralni vektori oslobodili iz stanica. Centrifugiranjem tijekom 10 min pri 3600 x g odvajaju se grubi raspadnuti ostaci stanica (talog) i oslobođene čestice adenoviralnih vektora (supernatant). Adenoviralni vektori iz supernatanta se dalje pročišćavaju u dva koraka: prvo na jastučiću cezijevoj klorida (CsCl), a potom u gradijentu CsCl. Pročišćavanje na jastučiću CsCl započinje tako da se u epruvetu za centrifugiranje dodaje 2.4 mL CsCl gustoće 1.4 g/mL i na njega nježno uz stijenku nadsloji 2.4 mL CsCl gustoće 1.25 g/mL pazeći da ne dođe do miješanja slojeva. Nadalje se u epruvetu za centrifugiranje dodaje supernatant lizata stanica s oslobođenim česticama adenoviralnih vektora i potom se do vrha epruvete dodaje DMEM-FBS_{10%} hranjiva pologa. Uzorci se centrifugiraju u Beckman ultracentrifugi u rotoru SW41Ti tijekom 1 h i 45 min pri 20°C i 60 000 x g. Nakon centrifugiranja vidljiv je sloj adenoviralnih vektora kao bijela opalescentna vrpca na granici između dva sloja CsCl i iznad tog sloja druga zona s nepotpunim česticama adenoviralnih vektora (npr. prazna kapsida). Sloj adenoviralnih vektora se pažljivo pomoću šprice s iglom pokupi u volumenu do 1.5 mL i pomiješa u novoj epruveti za centrifugiranje s CsCl gustoće 1.34 g/mL do vrha epruvete za centrifugiranje. Uzorci se centrifugiraju u Beckman centrifugi u rotoru SW41Ti preko noći pri 20°C i 60 000 x g. Tijekom centrifugiranja stvara se gradijent gustoće CsCl i adenoviralni vektori se zaustavljaju u području koje je jednake gustoće kao i gustoća adenoviralnih vektora. Adenoviralni vektori se pomoću šprice s iglom skupljaju u novu epruvetu nakon čega se CsCl uklanja tehnikom

gel-filtracije pomoću kolone Sephadex G-25M (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Kolona se pričvrsti za stalak, vrh joj se odreže škarama i potom se odčepi s gornje strane kako bi tekućina sama iscurila iz kolone. Potom se kolona 6 puta ispire s po 5 mL pufera PBS nakon čega se na kolonu dodaje pročišćeni adenoviralni vektor (ne više od 1 mL) i u mikroepruvetu se skupi eluat (frakcija 0). Nadalje se dodaje po 0.5 mL pufera PBS na kolonu, pritom skupljajući frakcije u brojem obilježene mikroepruvete. Frakcije u kojima se nalazi adenoviralni vektor se skupe te im se dodaje glicerol tako da mu konačan volumni udio bude 10%. Suspenzija adenoviralnih vektora se razdijeli u alikvote i smrzava pri -80°C .

3.2.3. Obilježavanje adenovirusa fluorescentnom bojom

Nakon pročišćavanja, adenoviralne čestice su inkubirane s fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488 5-TFP koja se veže amidnom vezom na primarne amine proteina kapside adenovirusa i koja je stabilna pri neutralnom pH tijekom nekoliko sati. Alexa Fluor 488 5-TFP dodaje se u 20 puta molarnom suvišku u odnosu na količinu adenovirusa u AF1 puferu i inkubira se 75 min u mraku pri sobnoj temperaturi uz miješanje. Ostatak boje koji se nije vezao na adenoviralne čestice uklonjen je korištenjem Zeba Spin desalinizirajuće kolone prema uputama proizvođača, pri čemu je za ispiranje kolona korišten pufer PBS Δ uz dodatak glicerola (konačnog volumnog udjela od 10%). Suspenzija fluorescentno obilježenih adenoviralnih vektora se razdijeli u alikvote i smrzava pri -80°C .

3.2.4. Određivanje koncentracije adenovirusa u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Za određivanje koncentracije čestica adenoviralnih vektora u suspenziji pročišćenih adenoviralnih vektora korištena je metoda Mitteredera i sur. (1996). Razrjeđenja pročišćenih adenoviralnih vektora pripremljena su u PS puferu i inkubirana 10 min pri 56°C da bi se oslobodila viralna DNA iz kapsida. Mikroepruvete s uzorcima se kratko centrifugiraju (30 s) pri $10000 \times g$ i tada se mjeri apsorbancija supernatanta pri 260 nm prema PS puferu. Vrijednosti apsorbancije trebaju biti između 0.02 i 0.15. Koncentracija viralnih čestica se računa prema formuli:

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

gdje je: N – broj viralnih čestica u mL
 A_{260} – izmjerena apsorbancija pri 260 nm
 r – razrjeđenje suspenzije adenovirusa

3.2.5. Određivanje uspješnosti transdukcije adenoviralnim vektorima

Stanice su nasadene u pločice za uzgoj kulture stanica s 12 bunarića (5×10^4 stanica po bunariću) te su nakon 24 h transducirane s HAdV u konačnom volumenu od 500 μ L. Broj dodanih adenoviralnih čestica po stanici (engl. *multiplicity of infection*, MOI) je za pojedini pokus naveden u opisu slike u poglavlju Rezultati. Dva sata nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, HAdV su isprani sa stanica i dodana je svježa hranjiva podloga za uzgoj (1.5 mL). Nakon 48 h inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, uklonjena je hranjiva podloga sa stanica i one su isprane s PBS Δ (500 μ L) te je dodan tripsin (300 μ L). Nakon odvajanja stanica od podloge, dodan je PBS Δ (1.5 mL) te je uzorak centrifugiran 10 min pri 1100 x g. Supernatant je uklonjen, a stanični talog je resuspendiran u 100 μ L PFA_{1%}/PBS pufera kako bi se stanice fiksirale. Nakon inkubacije 10 min pri sobnoj temperaturi, stanice su isprane s PBS Δ (500 μ L) i centrifugirane 10 min pri 1100 x g. Supernatant je uklonjen, a postupak ispiranja s PBS Δ ponovljen. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica je resuspendiran u 250 μ L PBS Δ . Ovako pripremljenom uzorku određena je uspješnost transdukcije protočnom citometrijom na uređaju FACSCalibur. Stanice u protočnom citometru prolaze kroz lasersku zraku pri čemu dolazi do emisije fotona određene valne duljine, a signal se bilježi detektorom. Ekscitacijska valna duljina za GFP iz HAdV iznosi 488 nm, a emisijska valna duljina 578 nm. Rezultati su prikazani kao uspješnost transdukcije koja odgovara geometrijskoj srednjoj vrijednosti intenziteta fluorescencije prikazanoj kao apsolutna ili relativna vrijednost.

3.2.6. Određivanje vezanja i internalizacije adenovirusa

Stanice su nasadene u pločice za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića (3×10^5 stanica po bunariću) te su nakon 24 h inkubirane s HAdV26 (MOI 10^3). Za vezanje je razrjeđenje HAdV26 (500 μ L) inkubirano na stanicama 1 h na ledu, nakon čega su nevezani virusi isprani dva puta s hladnim tripsinom (4°C, 500 μ L), zatim jednom s hladnim PBS Δ (4°C, 500 μ L) te su potom stanice s vezanim virusima skupljene struganjem u PBS Δ (4°C, 500 μ L). Za internalizaciju je razrjeđenje HAdV26 (500 μ L) inkubirano na stanicama 1 h pri 37°C, nakon čega su neinternalizirani virusi isprani dva puta s PBS Δ (37°C, 500 μ L), zatim jednom s tripsinom (37°C, 500 μ L) te su potom stanice skupljene nakon odvajanja od podloge korištenjem tripsina (37°C, 500 μ L). I za vezanje i za internalizaciju iz taloga stanica je izolirana ukupna DNA (stanična i viralna) korištenjem kompleta QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Izolirana DNA je korištena za kvantifikaciju adenoviralne DNA metodom *Real Time PCR* (metoda detaljnije opisana u poglavlju 3.2.14.) s početnicama specifičnim za CMV regiju virusa (Tablica 10). Korišteno je 100 ng DNA po uzorku. Rezultati su normalizirani prema ekspresiji jednoliko eksprimiranog (engl. *housekeeping*) gena GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

3.2.7. Određivanje ekspresije receptora na površini stanica protočnom citometrijom

Metoda neizravne protočne citometrije je korištena za određivanje ekspresije proteina na površini stanica. Stanice su uzgajane do 80% potpunosti površine Petrijeve zdjelice. Uklonjena je hranjiva podloga sa stanica i stanice su isprane dva puta s PBS Δ , nakon čega je dodan tripsin da bi se stanice odvojile od podloge za rast. Odvajanje stanica od podloge je praćeno svjetlosnim mikroskopom. Djelovanje tripsina je zaustavljeno dodatkom hranjive podloge, nakon čega su stanice resuspendirane. Koncentracija stanica određena je pomoću brojača stanica. Za pojedini uzorak je korišteno 5×10^5 stanica koje su prebačene u mikroeprevetu, centrifugirane 10 min pri 1100 x g i talog stanica je dva puta ispran s hladnim PBS Δ (4°C, 500 μ L). Talog stanica je resuspendiran u 50 μ L razrjeđenja primarnog protutijela (Tablica 8) i inkubiran 1 h na ledu, nakon čega je uzorak ispran dva puta s hladnim PBS Δ (4°C, 500 μ L). Talog

stanica je resuspendiran u 50 μ L razrjeđenja sekundarnog protutijela (Tablica 8) koje je obilježeno fluorescentnom bojom FITC (fluorescein izotiocijanat). Uzorak je inkubiran 1 h na ledu u mraku, nakon čega je ispran tri puta s hladnim PBS Δ (4°C, 500 μ L) i potom resuspendiran u PBS Δ (4°C, 250 μ L) te čuvan u ledu do analize na protočnom citometru FACSCalibur. Stanice u protočnom citometru prolaze kroz lasersku zraku pri čemu dolazi do emisije fotona određene valne duljine, a signal se bilježi detektorom. Ekscitacijska valna duljina za FITC iznosi 488 nm, a emisijska valna duljina 578 nm. Rezultati su prikazani kao MFI vrijednosti koje odgovaraju geometrijskoj srednjoj vrijednosti intenziteta fluorescencije prikazanoj kao apsolutna ili relativna vrijednost.

3.2.8. Utišavanje gena transfekcijom malih interferirajućih RNA molekula

Kako bi se utišala ekspresija gena koji kodiraju za dinamin-2, klatrin ili kaveolin-1, stanice su transficirane predizajniranim specifičnim malim interferirajućim RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) (Ambion, SAD) uz pomoć komercijalno dostupnog reagensa Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific, SAD). Stanice su nasade u odgovarajuću posudu za uzgoj kulture stanica do potpunosti površine oko 75% te transficirane specifičnom siRNA i kontrolnom siRNA pomoću Lipofectamine RNAiMAX reagensa prema uputama proizvođača. Korištene konačne koncentracije siRNA su: 35 nM za utišavanje klatrina (si(CLTC)) i dinamina-2 (si(DNM2)) s pripadajućom izotipskom kontrolom (si(-)) te 25 nM za utišavanje kaveolina-1 (si(CAV-1)) s pripadajućom izotipskom kontrolom (si(-)).

Ovako pripremljene stanice korištene su za određivanje uspješnosti transdukcije, površinske ekspresije proteina, ukupne ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot te unutarstaničnog putovanja fluorescentno obilježenih adenovirusa.

3.2.9. Izdvajanje klonova A549 stanične linije s povećanom ili smanjenom ekspresijom proteina od interesa

Klonovi A549 stanica sa stabilno povećanom ekspresijom α v (A549- α v) ili β 3 (A549- β 3) integrina te sa smanjenom ekspresijom klatrina (A549-shCLTC) ili kaveolina-1

(A549-shCAV-1) dobiveni su transfekcijom plazmidima koji sadrže gene za otpornost na antibiotik (za odabir uspješno transficiranih stanica) i shRNA (engl. *short hairpin RNA*) specifična za pojedini protein (Tablica 15). Koncentracije antibiotika određene su iskustveno i iznose 600 µg/mL za geneticin (G418) te 1 µg/mL za puromicin.

Tablica 15. Plazmidi korišteni za izdvajanje klonova stanične linije A549 s povećanom ili smanjenom ekspresijom proteina od interesa.

| Oznaka plazmida | Ime plazmida | Sadrži | Antibiotik | Izolirani klonovi | Izvor |
|-----------------|---------------------|---|------------------|--------------------------------|--|
| pl(αv) | pcDNA2004Neo (-)αv | gen za αv podjedinicu integrina | geneticin (G418) | A549-D4 A549-F1 A549-E6 | Thermo Fischer Scientific, SAD |
| pl(β3) | pcDNA β3 | gen za β3 podjedinicu integrina | geneticin (G418) | A549-B1 A549-B3 A549-B4 | dobiveno ljubaznošću dr. sc. E. H. Danen (Sveučilište u Leidenu, Nizozemska) |
| pl(shCAV-1) | pSuper-Neo-shCAV1-1 | shRNA specifičnu za kaveolin-1 | geneticin (G418) | klon 27 klon 86 klon 120 | dobiveno ljubaznošću dr. sc. Yong Keun Jung |
| pl(shCLTC) | pSUPER-shCLTC | shRNA specifičnu za klatrin | puromicin | klon 58 klon 69 | prethodno konstruirano u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala |
| pl(vektor) | pSUPER | okosnicu plazmida pl(shCLTC) bez shCLTC | puromicin | klon NEG | OligoEngine, SAD |

Stanice su nasade u Petrijevu zdjelicu promjera 3.5 cm (10^5 stanica) te su nakon 24 h transficirane plazmidom uz pomoć komercijalno dostupnog reagensa Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. 2500 ng plazmidne DNA je dodano u mikroeprevetu 1 s 250 µL Opti-MEM, a 12 µL reagensa Lipofectamine u mikroeprevetu 2 s 250 µL Opti-MEM. Sadržaj dviju mikroepreveta je pomiješan i inkubiran 5 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega je dodan na stanice na kojima se prethodno nalazi 500 µL hranjive podloge. 24 h nakon transfekcije stanice su rasađene na dvadeset puta veću površinu u Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica u hranjivu podlogu uz dodatak antibiotika (geneticin ili puromicin, ovisno o korištenom plazmidu). Hranjiva podloga s antibiotikom mijenja se svaka 4 dana do pojave prvih kolonija stanica. Pojedinačne kolonije su izdvojene struganjem sa sterilnim plastičnim

nastavkom za mikropipetu i prenesene u bunariće pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića u koje je prethodno dodano 150 μ L hranjive podloge uz dodatak antibiotika. Klonovi su, nakon što su popunili bunarić pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, prebačeni u pločicu za uzgoj kulture stanica s 24 i konačno, 6 bunarića. Klonovima koji su prekrili površinu bunarića u pločici sa 6 bunarića je provjerena uspješnost smanjenja ili povećanja proteina od interesa metodom protočne citometrije ili western blot. Nakon probira pozitivnih klonova, stanice su dalje uzgajane u hranjivoj podlozi bez antibiotika.

3.2.10. Unutarstanično putovanje fluorescentno obilježenih adenovirusa

Stanice su nasađene na stakalca u pločicu za uzgoj kulture stanica s 24 bunarića (2 x 10⁴ stanica po bunariću). Nakon nasađivanja stanice su transducirane (300 μ L po bunariću) prema sljedećim uvjetima:

- za pokus u kojemu se prati unutarstanično putovanje HAdV26 u A549 stanicama i klonovima A549-B4 te A549-E6 stanice su 48 h nakon nasađivanja transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 5 x 10⁴) i inkubirane 30 min na ledu te 2 h pri 37°C.
- za pokus u kojemu se uspoređuje unutarstanično putovanje HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 staničnoj liniji, stanice su 48 h nakon nasađivanja transducirane s HAdV5-AF488, HAdV26-AF488 ili HAdV35-AF488 (svi MOI 1 x 10⁴) i inkubirane 30 min na ledu te 1 h pri 37°C.
- za pokus u kojemu se uspoređuje unutarstanično putovanje HAdV5 i HAdV26 u pet vremenskih točaka, stanice su 48 h nakon nasađivanja transducirane s HAdV5-AF488 (MOI 5 x 10³) ili HAdV26-AF488 (MOI 2 x 10⁴) i inkubirane 45 min na ledu te 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h ili 4 h pri 37°C.
- za pokuse u kojima se prati unutarstanično putovanje HAdV nakon utišavanja dinamina-2, klatrina ili kaveolina-1, stanice su nakon 24 h utišane kako je opisano u poglavlju 3.2.8. 48 h nakon transfekcije sa specifičnim siRNA, stanice su transducirane s: HAdV5-AF488 (MOI 5 x 10³) ili HAdV26-AF488 (MOI 2 x 10⁴) i inkubirane 30 min na ledu te 1 h pri 37°C.
- za pokuse u kojima se prati unutarstanično putovanje HAdV26 u A549-shCLTC klonovima i A549-shCAV-1 klonovima, stanice su 48 h nakon nasađivanja

transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) i inkubirane 30 min na ledu te 2 h pri 37°C.

Nakon transdukcije, nevezani virusi su isprani tri puta s PBSΔ, zatim su stanice fiksirane dodavanjem 2% otopine paraformaldehida (PFA) tijekom 12 min pri sobnoj temperaturi i potom dva puta isprane s PBSΔ. Dodan je amonijev klorid (NH₄Cl, 25 mM u PBSΔ) tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi kako bi se smanjio fluorescentni signal molekula izvan stanica, nakon čega su stanice dva puta isprane s PBSΔ. Stanice su permeabilizirane dodavanjem PBSΔ-0.1% Triton X-100 tijekom 2 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega su stanice dva puta isprane s PBSΔ i inkubirane s PBSΔ-3% BSA kroz 30 min pri sobnoj temperaturi kako bi se smanjilo nespecifično vezanje protutijela ili korištenih boja. U pokusima u kojima je fluorescentno obilježen protein od interesa (klatrin, dinamin-2, kaveolin-1), stanice su inkubirane s primarnim protutijelom 60 min pri sobnoj temperaturi, tri puta isprane s PBSΔ, inkubirane sa sekundarnim protutijelom 60 min pri sobnoj temperaturi u mraku te su stanice tri puta isprane s PBSΔ. Korištena primarna i sekundarna protutijela navedena su u Tablici 8. Stanicama je nakon inkubacije s PBSΔ-3% BSA ili protutijelima dodan faloidin tijekom 20 min pri sobnoj temperaturi kako bi se fluorescentno obilježio aktin, nakon čega su stanice dva puta isprane s PBSΔ, jednom s diH₂O te su uklopljene u medij za uklapanje koji sadrži DAPI kako bi se fluorescentno obilježile jezgre.

Uzorci su snimani pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Njemačka) koristeći HC PL APO CS2 63×/1.40 objektiv, a analizirani pomoću programa Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Njemačka) i ImageJ. Prikazana su reprezentativna vidna polja maksimalnih projekcija konfokalnih snimaka svih snimaljenih slojeva. Kvantifikacija uspješnosti internalizacije HAdV u stanice je prikazana kao broj viralnih čestica po stanici, uz prikazanu srednju vrijednost i standardne devijacije. N označava broj analiziranih stanica u pojedinom uzorku.

3.2.11. Unutarstanično putovanje HAdV26 i kolokalizacija s $\alpha\beta3$ integrinom, EEA1, LAMP1 ili Golgijevim tijelom

Stanice su nasađene na stakalca u pločicu za uzgoj kulture stanica sa 24 bunarića (2×10^4 stanica po bunariću). Nakon nasađivanja stanice su transducirane (300 μL po bunariću) prema sljedećim uvjetima:

- za kolokalizaciju s $\alpha\beta3$ integrinom, stanice su 48 h nakon nasađivanja transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 5×10^4) tijekom 30 min na ledu te 1 min pri 37°C .
- za kolokalizaciju s EEA1, LAMP1 ili Golgijevim tijelom, stanice su 48 h nakon nasađivanja transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) tijekom 30 min na ledu te određeno vremensko razdoblje pri 37°C .

Nakon transdukcije, nevezani virusi su isprani dva puta s PBS Δ , zatim su stanice fiksirane dodavanjem 2% otopine paraformaldehida (PFA) tijekom 12 min pri sobnoj temperaturi i potom dva puta isprane s PBS Δ . Stanice su permeabilizirane dodavanjem PBS Δ -0.1% Triton X-100 tijekom 2 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega su stanice dva puta isprane s PBS Δ i inkubirane s PBS Δ -3% BSA kroz 30 min pri sobnoj temperaturi. Stanice su inkubirane s primarnim protutijelom 60 min pri sobnoj temperaturi, tri puta isprane s PBS Δ , inkubirane sa sekundarnim protutijelom 60 min pri sobnoj temperaturi u mraku te su stanice tri puta isprane s PBS Δ . Korištena primarna i sekundarna protutijela navedena su u Tablici 8. U sljedećem koraku:

- za kolokalizaciju s $\alpha\beta3$ integrinom, stanice su dva puta isprane s PBS Δ , jednom s diH_2O te su uklopljene u medij za uklapanje.
- za kolokalizaciju s EEA1, LAMP1 ili Golgijevim tijelom, na stanice je dodan faloidin tijekom 20 min pri sobnoj temperaturi kako bi se fluorescentno obilježio aktin, nakon čega su stanice dva puta isprane s PBS Δ , jedan puta s diH_2O te su uklopljene u medij za uklapanje koji sadrži DAPI kako bi se fluorescentno obilježile jezgre.

Uzorci su snimani pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Njemačka) koristeći HC PL APO CS2 63 \times /1.40 objektiv, a analizirani pomoću programa Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Njemačka) i ImageJ. Prikazane su reprezentativna vidna polja maksimalnih projekcija konfokalnih

snimaka po slojevima. Kvantifikacija kolokalizacije, prikazana kao % kolokalizacije, tj. udio viralnih čestica koje kolokaliziraju, određena je po slojevima konfokalnih snimaka.

3.2.12. Istraživanje urođenog imunskog odgovora stanica na infekciju s adenovirusima

Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića (3×10^5 stanica po bunariću) te su nakon 24 h inkubirane s HAdV5, HAdV26 ili HAdV35 (za sve MOI 10^4) ili u hranjivoj podlozi (kontrolni uzorak). Nakon 6 h i 24 h supernatant iznad stanica je skupljen u mikroeprevetu i spremljen pri -20°C do analize izlučenih citokina i kemokina ELISA metodom. Nakon 1 h, 3 h ili 6 h, stanice su isprane s PBS Δ (37°C , 500 μL) te su potom stanice skupljene nakon odvajanja od podloge korištenjem tripsina (37°C , 500 μL). Stanice su centrifugirane 5 min pri 1100 x g, a talog stanica je korišten za izolaciju ukupne RNA iz stanica i adenoviralnih čestica. Za izdvajanje ukupne RNA korišten je komplet *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche, SAD) prema uputama proizvođača. Koncentracija RNA određena je spektrofotometrijski mjerenjem asporbancije pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm i izračunata prema formuli:

$$\gamma(\text{RNA}) = A_{260} \cdot R \cdot 44.19$$

gdje je:

- $\gamma(\text{RNA})$ – koncentracija RNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
- A_{260} – izmjerena apsorbanca pri 260 nm
- R – razrjeđenje uzorka u diH₂O

Kao referentni uzorak pri mjerenju apsorbancaje korišten je pufer za eluciju iz kompleta *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche, SAD). Kvaliteta RNA određena je računanjem omjera između A_{260}/A_{280} koji iznosi između 1.8 i 2.1 te je dodatno provjerena elektroforezom na agaroznom gelu (rezultati nisu prikazani).

Izolirana ukupna RNA korištena je za obrnuto prepisivanje (reverznu transkripciju, RT) pomoću kompleta *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije korišteni za sintezu jednolančane komplementarne DNA (cDNA) iz ukupne RNA navedeni su u Tablici 16.

Tablica 16. Koncentracije komponenata za jedan uzorak RT i uvjeti reakcije.

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

cDNA dobivena obrnutim prepisivanjem izdvojene ukupne RNA korištena je za određivanje ekspresije citokina i kemokina koji su potaknuti infekcijom s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 te za određivanje ekspresije gena uključenih u inflammasom nakon infekcije stanica s HAdV26.

3.2.13. Određivanje količine izlučenih citokina i kemokina nakon infekcije adenovirusima

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je metoda pomoću koje su određene količine izlučenih citokina i kemokina nakon infekcije adenovirusima. ELISA se temelji na visokoj specifičnosti interakcija između protutijela i antigena te je ovom metodom moguće dokazati prisutnost i odrediti koncentraciju različitih antigena. U ovom radu za ELISA metodu korišteni su IL-6, IL-8 i IL-1 β *Human Uncoated ELISA Kit* (Invitrogen, USA) prema uputama proizvođača. Ukratko, korištena je tzv. *Sandwich ELISA* kod koje su ELISA pločice obložene s veznim protutijelom, nakon čega je dodan supernatant infekcije pri čemu dolazi do vezanja antigena na vezno protutijelo, a nakon toga je dodano detekcijsko protutijelo također specifično za drugi epitop istog antigena. Detekcijsko protutijelo ima vezan biotin stoga se dodavanjem avidin-HRP otopine avidin veže na biotin. HRP (engl. *horseradish peroxidase*) je enzim peroksidaza, izolirana iz hrena, koji prevodi naknadno dodani supstrat u kolorimetrijski produkt koji je kvantificiran spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 570 nm i 450 nm.

3.2.14. Određivanje ekspresije citokina i kemokina koji su potaknuti infekcijom s adenovirusima

Za određivanje ekspresije citokina i kemokina korištena je lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (engl. *Real Time RT-PCR*). Metoda se sastoji od ponavljajućih ciklusa u kojima se cDNA denaturira nakon čega dolazi do vezanja specifičnih početnica za pojedini gen te do produljivanja početnica i sinteze komplementarnog lanca pomoću DNA polimeraze. Nakon svakog ciklusa mjeri se količina DNA određivanjem signala fluorescentne boje *SYBR Green* (Applied Biosystems, SAD) koja se veže na DNA (interkalira između lanaca dvolančane DNA) te je fluorescentni signal direktno proporcionalan broju kopija umnožene DNA. Kao finalni rezultat očitava se broj ciklusa (C_T , engl. *threshold cycle*) u kojem emisija fluorescencije prijeđe postavljeni prag iznad nespecifičnog signala. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 17. Za *Real Time RT-PCR* korišten je uređaj StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, SAD). Program StepOneSoftware (v 2.3) (Applied Biosystems, SAD) je korišten za dobivanje C_T vrijednosti. Rezultati su normalizirani prema ekspresiji jednoliko eksprimiranog gena GAPDH za dobivanje $\Delta\Delta C_T$, a relativna promjena je izračunata po standardnoj metodi $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak i Schmittegen, 2001).

Tablica 17. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije Real Time PCR

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

3.2.15. Određivanje ekspresije gena uključenih u inflamasiom nakon infekcije stanica s HAdV26

Za određivanje ekspresije gena uključenih u inflamasiom nakon infekcije stanica s HAdV26 korišten je komplet *RT2 PCR Profiler Array* (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Uzorci cDNA koji su korišteni su uzorak od 1 h nakon infekcije s HAdV26 i pripadajući kontrolni uzorak (1 h, neinficirane stanice). Rezultati su normalizirani prema ekspresiji jednoliko eksprimiranog gena GAPDH. Uvjeti rada su sljedeći: 10 min pri 95°C, zatim 40 ciklusa 15 s pri 95°C te 1 min pri 60°C.

3.2.16. Analiza ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot

Za analizu ekspresije proteina klatrina, dinamina-2 i kaveolina-1 nakon utišavanja gena transfekcijom siRNA ili za analizu ekspresije proteina klatrina i kaveolina-1 u A549-shCLTC i A549-shCAV-1 klonovima korištene su metode SDS-PAGE i western blot. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pomoću natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) omogućuje razdvajanje proteina samo na temelju razlike u molekularnoj masi.

Stanični lizati su skupljeni iz 3×10^5 stanica po uzorku nakon dodavanja vrućeg (96°C) pufera za nanošenje uzoraka 1 x SB (engl. *sample buffer*, 150 µL po uzorku) pomoću sterilne strugalice kojom su lizirane stanice odvojene od podloge. Stanični lizati su skupljeni u mikroepruvetu nakon čega su izloženi ultrazvuku (3 x 5 sekundi s 30% amplitude) i kratko centrifugirani te zagrijani pri 96°C tijekom 5 min.

Gelovi su pripremljeni u plastičnim epruvetama od 50 mL i izlijevani u kalup za izlijevanje gela. Prvo se polimerizira gel za razdvajanje, u kojem proteini putuju samo na temelju razlike u molekularnoj masi, a zatim se na njega nadslojava gel za sabijanje, koji omogućava koncentriranje uzorka. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje prikazani su u Tablici 18.

Tablica 18. Sastav gelova za razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE.

| Oznaka plazmida | gel za sabijanje | gel za razdvajanje |
|------------------------------|------------------|--------------------|
| | 5% | 10% |
| | volumen (mL) | |
| diH ₂ O | 2.1 | 4.0 |
| akrilamid/bisakrilamid (30%) | 0.5 | 3.3 |
| Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M) | 0.38 | - |
| Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M) | - | 2.5 |
| 10% (w/v) SDS | 0.03 | 0.1 |
| 10% (w/v) APS | 0.03 | 0.1 |
| TEMED | 0.003 | 0.006 |
| Ukupni volumen | 3 | 10 |

25 μ L uzorka proteina je u gelu razdvojeno u Tris-glicinskom puferu za elektroforezu (pH 8.3) pri konstantnom naponu od 80 V. Kao standard za određivanje molekulskih masa nanešen je *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Proteini su s gela preneseni na nitroceluloznu membranu veličine pora 0.45 μ m (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska) mokrim prijenosom u polju struje jakosti 400 mA tijekom 90 minuta. Kako bi se provjerila uspješnost prijenosa proteina, membrana je obojana otopinom boje amidocrno tijekom 1 min na zibalici, nakon čega je odbojavana uzastopnim izmjenama svježje otopine za odbojavanje do pojave jasnih vrpca i tada je snimljena fotografija membrane. Membrana je zatim isprana u puferu TBST, blokirana u 5% nemasnom mlijeku u TBST puferu tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi te zatim inkubirana preko noći pri 4°C s primarnim protutijelom (Tablica 8). Sljedeći dan je membrana isprana jednom tijekom 15 min i pet puta tijekom 5 min u puferu TBST, nakon čega je inkubirana s odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Nakon ispiranja membrane jednom tijekom 15 min i pet puta tijekom 5 min u puferu TBST, vezanje sekundarnog protutijela je vizualizirano uz pomoć kemiluminiscentnog reagensa *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fischer Scientific, SAD) prema uputama proizvođača na uređaju ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, SAD). Kemiluminiscentni signal specifičnih vrpca te signal za bojanje ukupnih proteina (amidocrno) analizirani su pomoću programa ImageJ. Jačina signala za bojanje ukupnih proteina korištena je za normalizaciju rezultata.

3.2.17. Korištenje kemijskih inhibitora endocitoze

Određivanje uspješnosti transdukcije, vezanja i unutarstaničnog putovanja HAdV26 te ekspresije proteina na površini stanica nakon korištenja kemijskih inhibitora slijedi sljedeće protokole:

a) Određivanje uspješnosti transdukcije HAdV26:

Stanice su nasađene u pločice za uzgoj kulture stanica s 12 bunarića (5×10^4 stanica po bunariću) te su nakon 24 h inkubirane u 500 μ L hranjive podloge (kontrolni uzorak) ili razrjeđenju kemijskog inhibitora endocitoze. Nakon 30 min inkubacije u inkubatoru za uzgoj kultura stanica, stanice su transducirane s HAdV u konačnom volumenu od 500 μ L (u hranjivoj podlozi (kontrolni uzorak) ili razrjeđenju kemijskog inhibitora endocitoze). Sljedeći koraci isti su kao oni opisani u poglavlju 3.2.5.

b) Određivanje vezanja HAdV26:

Stanice su nasađene u pločice za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića (3×10^5 stanica po bunariću) te su nakon 24 h inkubirane u 500 μ L hranjive podloge (kontrolni uzorak) ili razrjeđenju pitstopa 2. Nakon inkubacije 30 min pri 37°C, stanice su 5 min ohlađene na ledu te je dodan HAdV26 (MOI 10^3). Za vezanje je razrjeđenje HAdV26 (500 μ L) inkubirano na stanicama 1 h na ledu. Sljedeći koraci isti su kao oni opisani u poglavlju 3.2.6.

c) Unutarstanično putovanje

Stanice su nasađene na stakalca u pločicu za uzgoj kulture stanica s 24 bunarića (2×10^4 stanica po bunariću) te su nakon 48 h inkubirane u hranjivoj podlozi (kontrolni uzorak) ili pitstopu 2 kroz 30 min pri 37°C. Zatim je dodan HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) i inkubiran 1 h pri 37°C. Nakon ispiranja nevezanih virusa dva puta s PBS Δ , stanice su u uvjetu bez oporavka fiksirane, dok su u uvjetu s oporavkom fiksirane nakon dodatne inkubacije 1 h pri 37°C u hranjivoj podlozi. Uzorcima je fluorescentno obilježen aktin korištenjem faloidina te jezgra korištenjem DAPI kako je opisano u poglavlju 3.2.10.

d) Ekspresija receptora

Metoda neizravne protočne citometrije je korištena za određivanje ekspresije proteina na površini stanica nakon djelovanja pitstopa 2. Stanice su nasađene u pločice za

uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića (3×10^5 stanica po bunariću) te su nakon 24 h inkubirane u hranjivoj podlozi (kontrolni uzorak) ili pitstopu 2 kroz 1.5 h pri 37°C. Nakon toga, stanice su isprane dva puta s hladnim PBSΔ, odvojene od podloge hladnim tripsinom (4°C, 500 μL), a sljedeći koraci isti su kao oni opisani u poglavlju 3.2.7.

U svim pokusima u kojima se koriste kemijski inhibitori endocitoze, hranjiva podloga je DMEM-FBS_{0.2%}.

3.2.18. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni rezultati analizirani su Student t-testom korištenjem programa GraphPad Prism i prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). U opisu slike dobivenih rezultata naveden je broj ponavljanja pokusa, a oznakom zvjezdica (*) označen je statistički značaj dok „ns“ označava da nema statističkog značaja (ns, engl. *non-significant*).

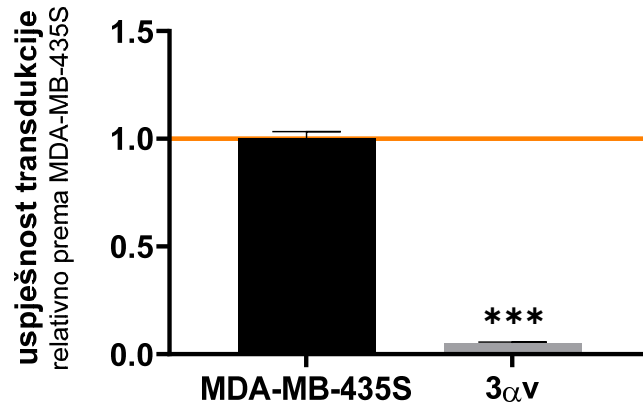
4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Uspješnost transdukcije epitelnih stanica čovjeka s HAdV26 ovisi o količini α v integrina na površini stanica

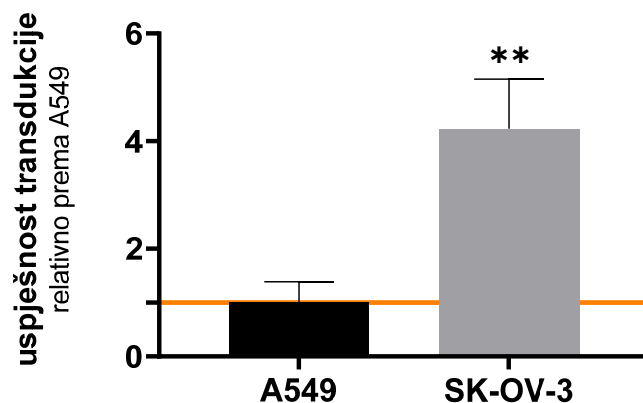
Koristeći stanične linije A549 i SK-OV-3 u grupi dr. sc. Majhen u kojoj je izrađena ova doktorska disertacija je pokazano da HAdV26 transducira stanice epitela čovjeka sa smanjenom uspješnosti u odnosu na HAdV5 i HAdV35 (Nestić i sur., 2019). Nadalje, smanjenjem ekspresije proteina CAR, CD46 i α v integrina transfekcijom specifičnim siRNA, zasebno i u svim kombinacijama po dvoje ili korištenjem blokirajućih protu-CAR, -CD46 i - α v integrin protutijela, pokazano je da CAR i CD46 nemaju utjecaj na uspješnost transdukcije s HAdV26, dok smanjena ekspresija ili nedostupnost α v integrina značajno smanjuju uspješnost transdukcije s HAdV26. Da bi se dodatno utvrdila uloga CAR i CD46 u uspješnosti transdukcije s HAdV26 korištena je stanična linija CHO (stanice ovarija kineskog hrčka, engl. *Chinese Hamster Ovary cells*) s pripadajućim klonovima koji imaju povećano eksprimirane proteine CAR (CHO-CAR) ili CD46 (CHO-BC1) (Trinh i sur., 2012). Pokazano je da povećana ekspresija CAR povećava uspješnu transdukciju s HAdV5, a nema utjecaj na uspješnost transdukcije s HAdV26, dok povećana ekspresija CD46 povećava uspješnost transdukcije s HAdV35, a nema utjecaj na uspješnost transdukcije s HAdV26. Da su α v integrini nužni za uspješnu transdukciju s HAdV26 pokazano je i u varijantama stanične linije melanoma M21: M21L (α v integrin negativne stanice) i M21L4 (α v integrin pozitivne stanice) (Petitclerc i sur., 1999), gdje je uspješna transdukcija s HAdV26 bila značajno viša u staničnoj liniji M21L4 nego u M21L. Na temelju preliminarnih rezultata pretpostavljeno je da HAdV26 za uspješnu transdukciju epitelnih stanica koristi α v integrine, dok CAR i CD46 nisu ključne molekule za uspješnu transdukciju s HAdV26.

Nužnost α v integrina za uspješnu transdukciju HAdV26 dodatno je potvrđena i u ovom radu mjerenjem uspješnosti transdukcije HAdV26 u staničnoj liniji melanoma MDA-MB-435S i pripadajućem klonu 3 α V sa smanjenom površinskom ekspresijom α v integrina (Paradžik i sur., 2020). Klon 3 α V ima gotovo 20 puta sniženu uspješnost transdukcije s HAdV26 u odnosu na roditeljsku staničnu liniju, što upućuje da su α v integrini izrazito važni za uspješnu transdukciju s HAdV26 (Slika 8).

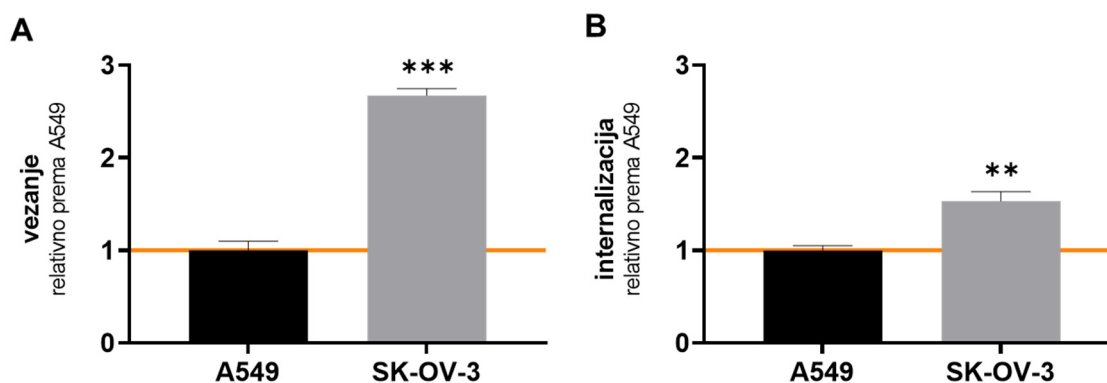


Slika 8. Uspješnost transdukcije HAdV26 u MDA-MB-435S stanicama te klonu 3 α v sa stabilno utišanim α v integrinom. Stanice su transducirane s HAdV26 (MOI 10⁴), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema MDA-MB-435S \pm SD. (***) $P < 0,001$).

Uspješnost transdukcije s HAdV26 je 4 puta viša u staničnoj liniji SK-OV-3 u odnosu na A549 (Slika 9), što može biti posljedica boljeg vezanja virusa na receptore na površini stanice i/ili njihove bolje internalizacije u stanicu. Mjerenjem vezanja i internalizacije HAdV26 u navedenim staničnim linijama pokazano je da se HAdV26 značajno bolje veže te bolje internalizira u SK-OV-3 staničnoj liniji nego A549 (Slika 10).



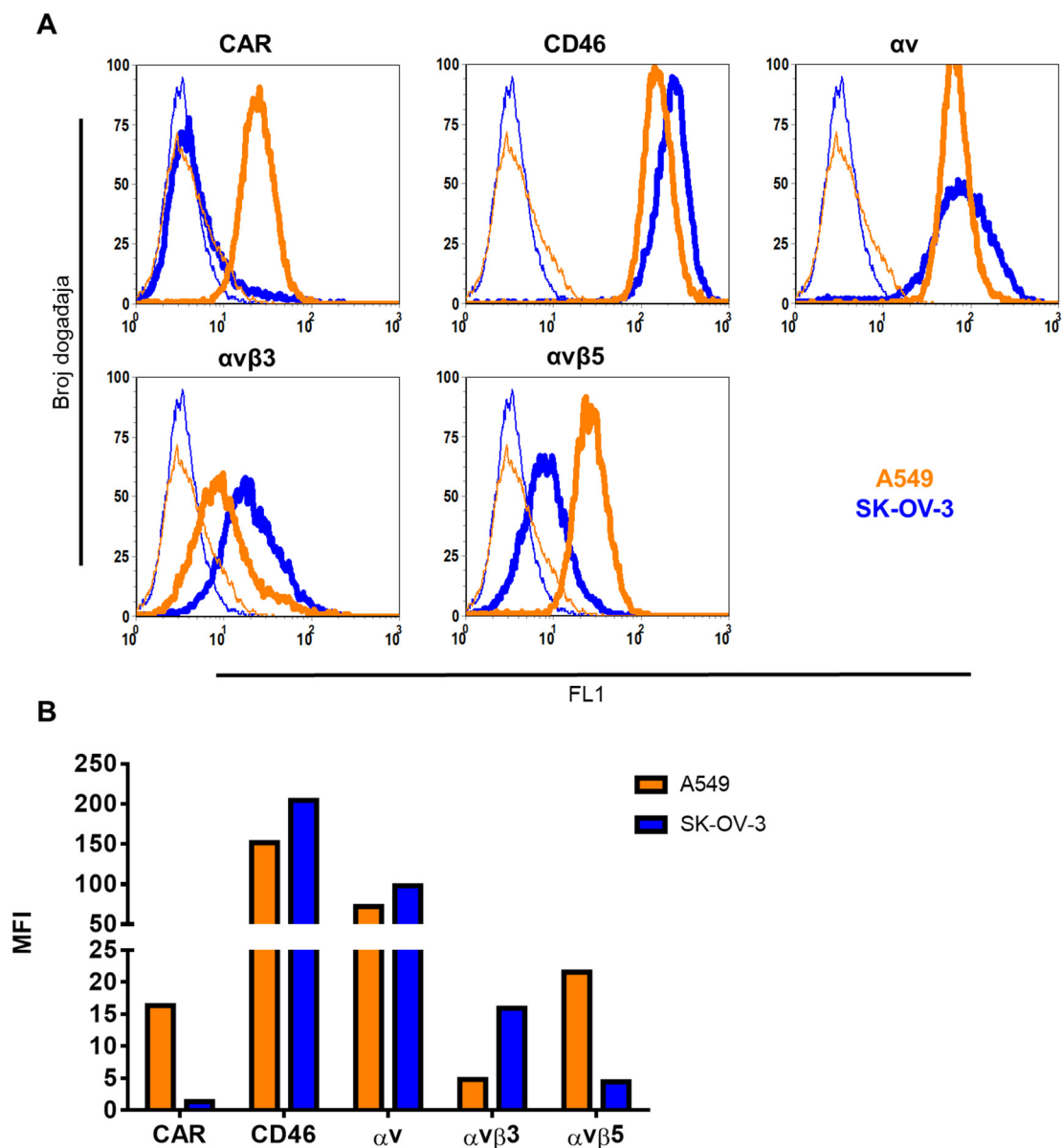
Slika 9. Uspješnost transdukcije HAdV26 u A549 i SK-OV-3 staničnoj liniji. Stanice su transducirane s HAdV26 (MOI 10⁴), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema A549 \pm SD. (** $P < 0,01$).



Slika 10. Vežanje (A) i internalizacija (B) HAdV26 u A549 i SK-OV-3 staničnim linijama. Stanice su inkubirane s HAdV26 (MOI 10^3) te je nakon vežanja ili internalizacije virusa iz taloga stanica izolirana ukupna DNA (stanična i viralna) korištena za kvantifikaciju viralne DNA metodom Real Time PCR s početnicama specifičnim za CMV regiju virusa. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrijednosti relativno u odnosu na A549 stanice \pm SD. (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

4.2. $\alpha\beta 3$ integrin neophodan je za uspješnu infekciju s HAdV26

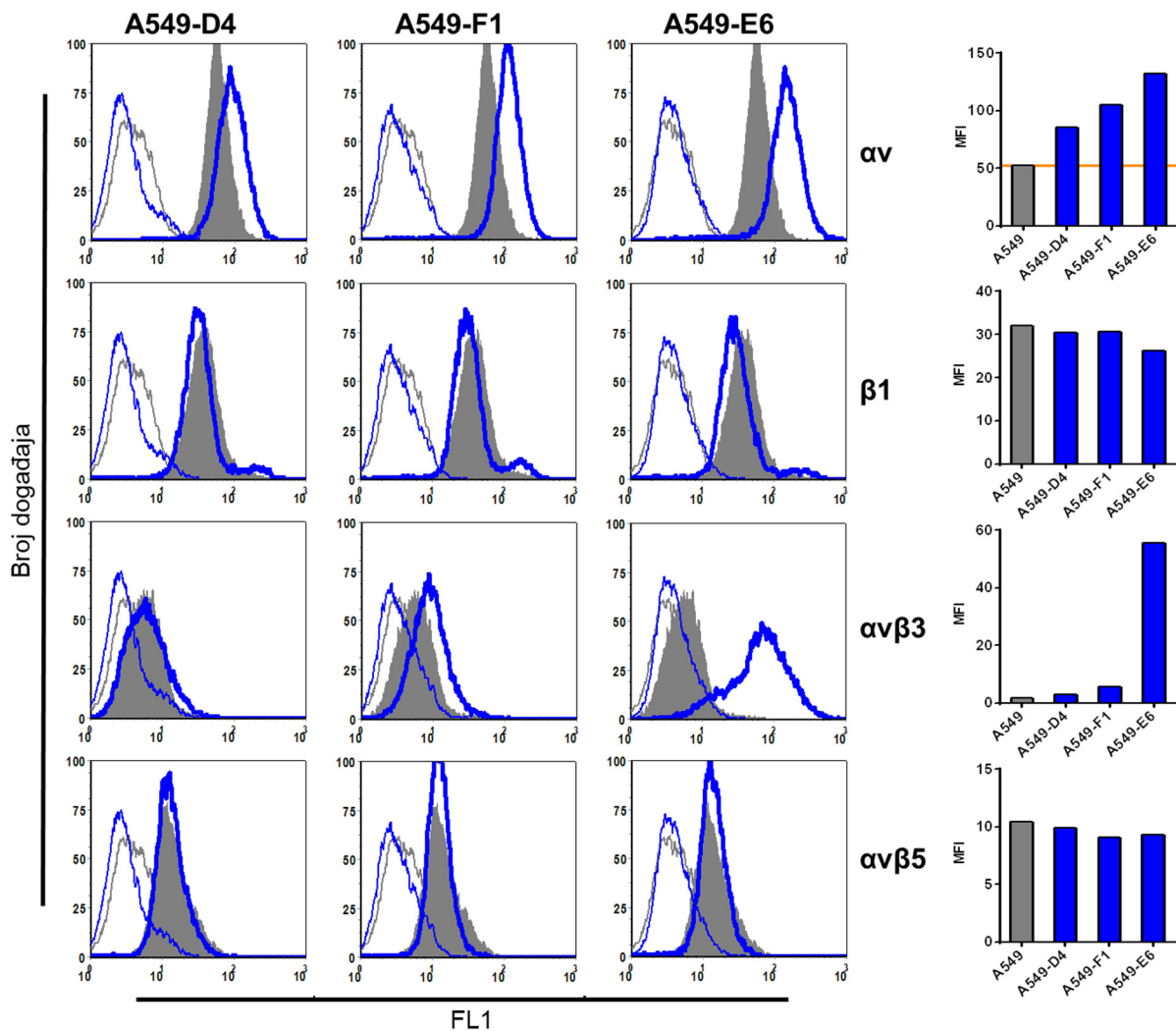
Prvi korak u infekciji adenovirusom je vežanje na receptor na površini ciljne stanice. S obzirom da se HAdV26 veže gotovo 3 puta bolje na površinu SK-OV-3 u odnosu na A549 stanice napravljena je analiza površinske ekspresije CAR, CD46 te αv , $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ integrina na ovim staničnim linijama (Slika 11). Stanična linija A549 ima visoku ekspresiju CAR, dok stanična linija SK-OV-3 ima vrlo nisku ekspresiju CAR. Navedene stanične linije imaju usporedivu površinsku ekspresiju CD46 i αv integrina, no stanična linija SK-OV-3 ipak ima neznatno višu ekspresiju oba proteina. Razlike postoje u ekspresiji $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ integrina, gdje stanična linija A549 u odnosu na SK-OV-3 ima nižu ekspresiju $\alpha\beta 3$ integrina, a višu ekspresiju $\alpha\beta 5$ integrina.



Slika 11. Površinska ekspresija CAR, CD46 te α V, α V β 3 i α V β 5 integrina na staničnim linijama A549 i SK-OV-3 prikazana kao histogrami (A) ili kao MFI vrijednosti (B). Histogrami tankih linija predstavljaju izotipske kontrole, a debljih linija ekspresiju odgovarajućeg proteina. Rezultati pod A su kvantificirani kao MFI vrijednosti i uspoređeni po odgovarajućim proteinima za stanične linije A549 i SK-OV-3.

S obzirom da je prethodno pokazano da smanjenje količine ili dostupnosti α V integrina u obje promatrane stanične linije, A549 i SK-OV-3, uzrokuje značajan pad uspješnosti transdukcije s HAdV26, u A549 stanicama je povećana ekspresija α V integrina stabilnom transfekcijom plazmidom koji kodira za α V integrin. Izdvojena su tri A549- α V klona koji u odnosu na roditeljske A549 stanice pokazuju povećanu ekspresiju α V integrina: A549-D4, A549-F1, A549-E6 (Slika 12). S obzirom da α V podjedinica integrina može stupiti u interakciju s β 1, β 3, β 5, β 6 i β 8 podjedinicom integrina na

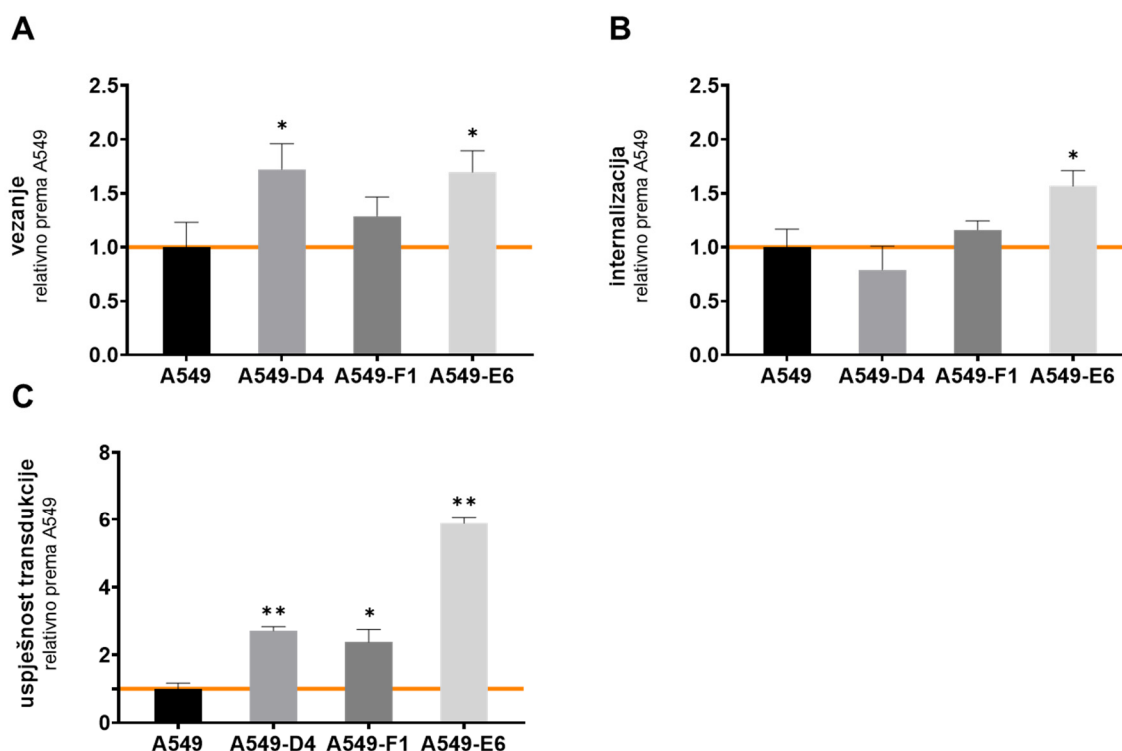
izdvojenim klonovima je osim ekspresije αv integrina izmjerena i ekspresija heterodimera $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ integrina te $\beta 1$ podjedinice integrina. Kako stanična linija A549 ne ekspresira $\beta 6$ i $\beta 8$ podjedinice integrina (217), heterodimeri $\alpha\beta 6$ i $\alpha\beta 8$ nisu mjereni. Dodatno, zbog nepostojanja protutijela specifičnog za heterodimer $\alpha\beta 1$ integrin, određena je samo količina $\beta 1$ podjedinice integrina. Povećanje ekspresije αv integrina nije značajno promijenilo površinsku ekspresiju $\alpha\beta 5$ integrina i $\beta 1$ podjedinice integrina, ali je zato značajno povećalo površinsku ekspresiju $\alpha\beta 3$ integrina i to tako da s povećanjem ekspresije αv integrina raste i ekspresija $\alpha\beta 3$ integrina, pri čemu klon A549-E6 koji ima najveću ekspresiju αv integrina ima 30 puta veću ekspresiju $\alpha\beta 3$ integrina u odnosu na A549 stanice.



Slika 12. Površinska ekspresija αv , $\beta 1$, $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ integrina na staničnoj liniji A549 i A549- αv klonovima. Histogrami tankih linija predstavljaju izotipske kontrole za A549 (sivom bojom) i odgovarajući A549- αv klon (plavom bojom), sivo ispunjeni histogrami predstavljaju odgovarajući protein

u A549, a histogrami označeni debljom plavom linijom predstavljaju ekspresiju odgovarajućeg proteina u pojedinom A549- α v klonu. Desno prikazani grafovi su kvantificirani histogrami kao MFI vrijednosti i uspoređeni po odgovarajućim proteinima za A549- α v klonove u odnosu na staničnu liniju A549. Narančasta linija predstavlja ekspresiju α v integrina u A549 stanicama.

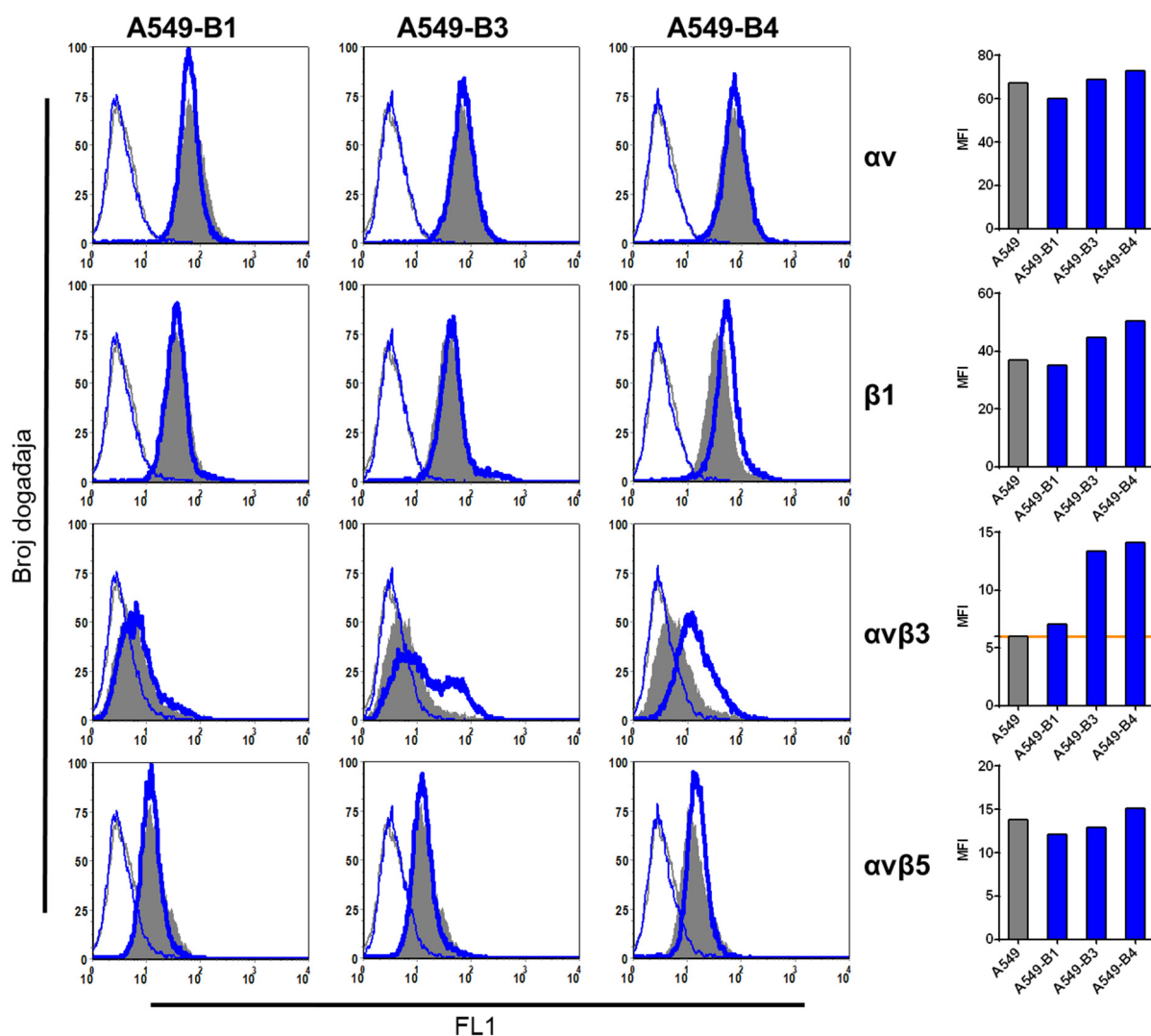
Kako bi se utvrdilo kakav utjecaj na infekciju s HAdV26 ima povećanje površinske ekspresije α v integrina, određeno je vezanje, internalizacija i uspješnost transdukcije HAdV26 u staničnoj liniji A549 i A549- α v klonovima (Slika 13). HAdV26 se veže na A549- α v klonove 1.5 puta bolje od A549, a samo u klon A549-E6 HAdV26 internalizira 1.5 puta bolje u odnosu na A549. Međutim, uspješnost transdukcije s HAdV26 je veća u sva tri A549- α v klona, osobito u klonu A549-E6 gdje je uspješnost transdukcije s HAdV26 u odnosu na A549 povećana gotovo 6 puta. Klon A549-E6 ima najveću površinsku ekspresiju α v integrina te je u odnosu na A549 pokazao povećanje u vezanju, internalizaciji i uspješnosti transdukcije s HAdV26. Ovi podaci potvrđuju da α v integrin ima važnu ulogu u vezanju i transdukciji s HAdV26.



Slika 13. Vezanje (A) i internalizacija (B) HAdV26 u A549 stanicama i A549- α v klonovima. Stanice su inkubirane s HAdV26 (MOI 10^3) te je nakon vezanja ili internalizacije virusa iz taloga stanica izolirana ukupna DNA (stanična i viralna) korištena za kvantifikaciju viralne DNA metodom Real Time PCR s početnicama specifičnim za CMV regiju virusa. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednosti relativno u odnosu na A549 stanice \pm SD. (* $P < 0,05$). **Uspješnost transdukcije (C) A549 stanica i A549- α v klonova s HAdV26.** Stanice su transducirane s HAdV26

(MOI 10⁴), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema A549 ± SD. (* *P* < 0,05; ** *P* < 0,01).

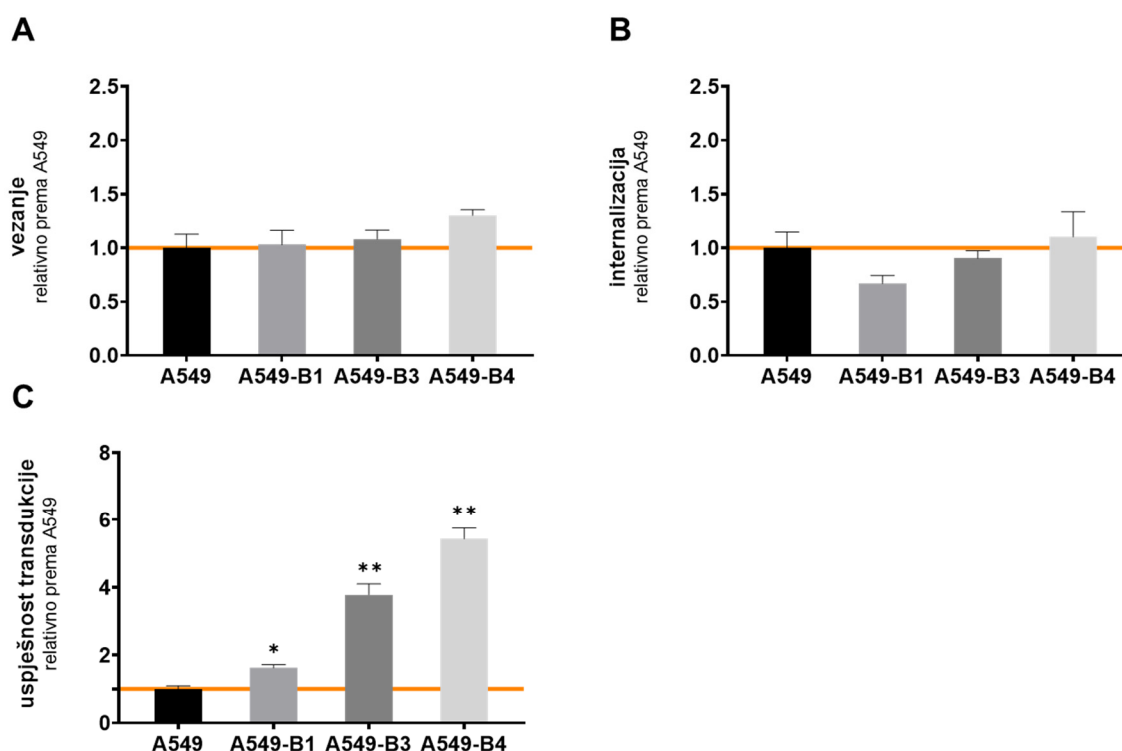
S obzirom da A549-E6 klon u odnosu na A549 i druge A549- α v klonove također ima najveću površinsku ekspresiju α v β 3 integrina pretpostavljeno je da je među α v integrinima upravo α v β 3 integrin molekula odgovorna za uspješnu transdukciju s HAdV26. Stoga su A549 stanice stabilno transficirane plazmidom koji kodira za β 3 podjedinicu integrina. Izdvojeni su A549- β 3 klonovi koji pokazuju povećanu ekspresiju β 3 integrina: A549-B1, A549-B3, A549-B4 (Slika 14). Pritom se A549- β 3 klonovi međusobno i u usporedbi s A549 stanicama ne razlikuju značajno po ekspresiji α v, α v β 5 i β 1 integrina.



Slika 14. Površinska ekspresija α v, β 1, α v β 3 i α v β 5 integrina na staničnoj liniji A549 i A549- β 3 klonovima. Histogrami tankih linija predstavljaju izotipske kontrole za A549 (sivom bojom) i odgovarajući A549- β 3 klon (plavom bojom), sivo ispunjeni histogrami predstavljaju odgovarajući protein u A549, a histogrami označeni debljom plavom linijom predstavljaju ekspresiju odgovarajućeg proteina

u pojedinom A549- β 3 klonu. Desno prikazani grafovi su kvantificirani histogrami kao MFI vrijednosti i uspoređeni po odgovarajućim proteinima za A549- α v klonove u odnosu na staničnu liniju A549. Narančasta linija predstavlja ekspresiju α v β 3 integrina u A549 stanicama.

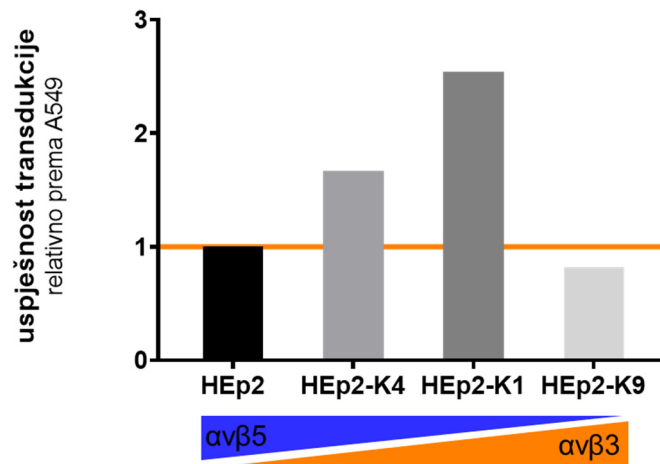
Vežanje i internalizacija HAdV26 nisu povećani kod A549- β 3 klonova u odnosu na A549 stanice, ali uspješnost transdukcije je značajno povećana na način da s povišenjem ekspresije α v β 3 integrina raste i uspješnost transdukcije s HAdV26 (Slika 15). Uspješnost transdukcije je kod klona A549-B1 1.6 puta, kod klona A549-B3 3.8 puta te kod klona A549-B4 5.4 puta viša u odnosu na A549.



Slika 15. Vežanje (A) i internalizacija (B) HAdV26 u A549 stanicama i A549- β 3 klonovima. Stanice su inkubirane s HAdV26 (MOI 10^3) te je nakon vežanja ili internalizacije virusa iz taloga stanica izolirana ukupna DNA (stanična i viralna) korištena za kvantifikaciju viralne DNA metodom Real Time PCR s početnicama specifičnim za CMV regiju virusa. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednosti relativno u odnosu na A549 stanice \pm SD. **Uspješnost transdukcije (C) A549 stanica i A549- β 3 klonova s HAdV26.** Stanice su transducirane s HAdV26 (MOI 10^4), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema A549 \pm SD. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Da povećana površinska ekspresija α v β 3 integrina povećava uspješnost transdukcije s HAdV26 potvrđeno je i na staničnoj liniji HEp2 s pripadajućim klonovima koji imaju povećanu ekspresiju α v β 3 integrina (Ambriović-Ristov i sur., 2004). Uspješnost

transdukcije s HAdV26 kod klonova HEp2-K4 i HEp2-K1 je povećana u odnosu na roditeljske HEp2 stanice i to na način da povećana uspješnost transdukcije prati povećanu ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina. Uspješnost transdukcije je u odnosu na HEp2 stanice povećana 1.5 puta kod klona HEp2-K4 te 2.5 puta kod klona HEp2-K1 (Slika 16).



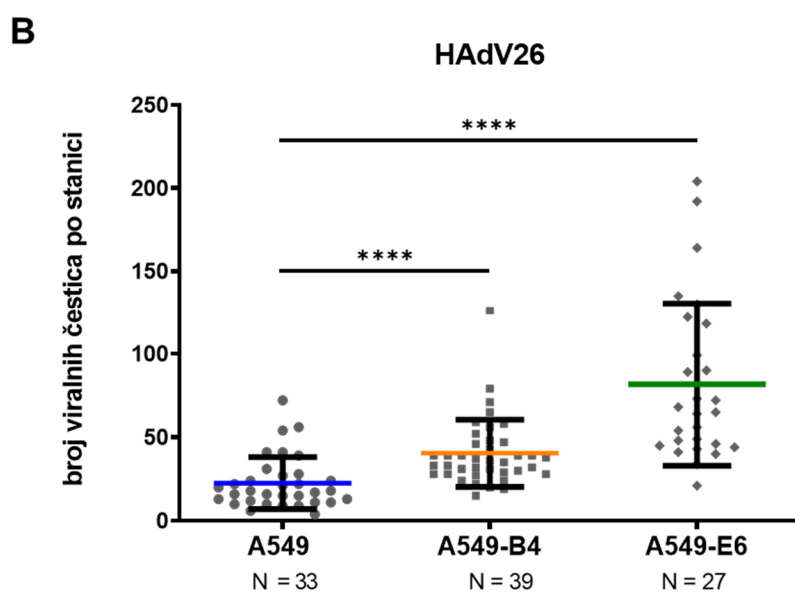
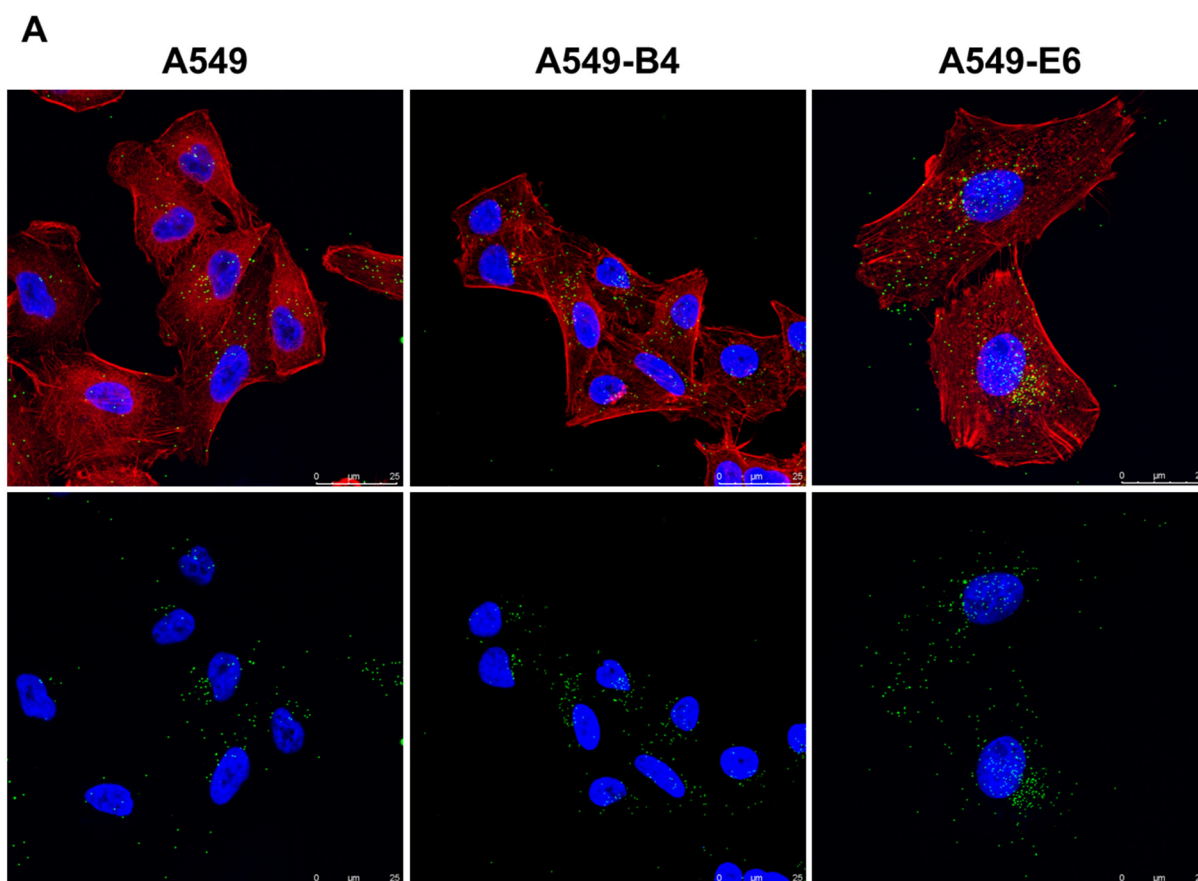
Slika 16. Uspješnost transdukcije s HAdV26 na HEp2 stanicama te HEp2- $\beta3$ klonovima sa stabilno povećanom ekspresijom $\beta3$ integrina. Stanice su transducirane s HAdV26 (MOI 10^4), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema HEp2. Dolje prikazani trokuti pokazuju smjer povećanja ekspresije $\alpha\beta3$ integrina (narančasto) i smanjenja ekspresije $\alpha\beta5$ integrina (plavo).

Uspješnost transdukcije s HAdV26 u klonu HEp2-K9 koji ima najveću ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina na površini stanica usporediva je s roditeljskim HEp2 stanicama. Osim što ima najveću ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina, klon HEp2-K9 ima izrazito smanjenu ekspresiju $\alpha\beta5$ integrina koji je odgovoran za uspješno oslobađanje adenovirusa iz endosoma pa je moguće pretpostaviti da je to razlog smanjene uspješnosti transdukcije s HAdV26. Isti učinak pokazali su i Majhen i sur. (2009) nakon transdukcije klona HEp2-K9 s HAdV5.

4.3. HAdV26 povećano ulazi u stanice s povećanom ekspresijom $\alpha\beta 3$ integrina i kolokalizira s $\alpha\beta 3$ integrinom

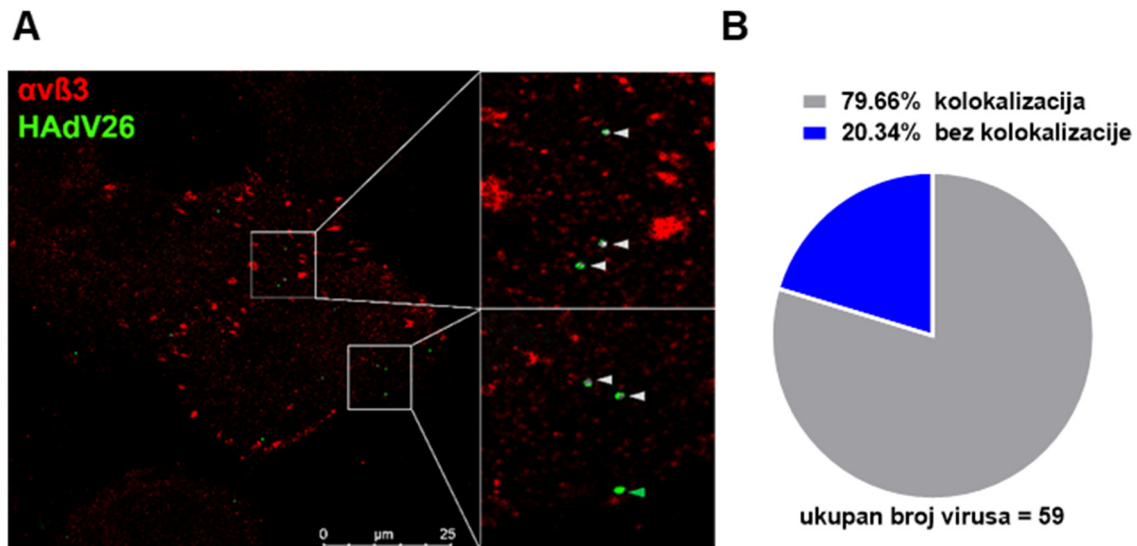
Kako bi se detaljnije istražila povezanost između povećane uspješnosti transdukcije s HAdV26 i povećane ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina na površini stanica, istraženo je unutarstanično putovanje fluorescentno obilježenog HAdV26 u staničnoj liniji A549 i klonovima A549-B4 (A549- $\beta 3$ klon) te A549-E6 (A549- α klon) korištenjem konfokalnog mikroskopa. HAdV26 je obilježen bojom AF488-5TFP koja se veže amidnom vezom na primarne amine proteina kapside adenovirusa i koja je stabilna pri neutralnom pH tijekom nekoliko sati.

Stanice su transducirane s fluorescentno obilježenim HAdV26 (HAdV26-AF488) i nakon 2 h fiksirane kako bi se utvrdio broj i unutarstanični smještaj uspješno internaliziranih adenoviralnih čestica. U A549 staničnoj liniji nalaze se prosječno 22 adenoviralne čestice po stanici, dok se u klonovima s povećanom ekspresijom $\alpha\beta 3$ integrina nalazi više adenoviralnih čestica po stanici, točnije 40 kod A549-B4 i 82 kod A549-E6 (Slika 17). Kako klon A549-E6 ima veću ekspresiju $\alpha\beta 3$ integrina na površini stanica može se zaključiti da povećanje ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina na površini stanica povećava internalizaciju i uspješnost transdukcije s HAdV26.



Slika 17. Unutarstanično putovanje HAdV26 u A549 stanicama i klonovima s povećanom ekspresijom $\alpha v\beta 3$ integrina (A). Stanice su transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 5×10^4) tijekom 2 h pri 37°C. Prikazana su reprezentativna vidna polja. Zeleno – HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI). Prikazane su maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije virusa (B)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica. (**** $P < 0,0001$).

Kako bismo provjerili da li se HAdV26 veže na $\alpha\beta3$ integrin, konfokalnim mikroskopom je ispitana kolokalizacija između fluorescentno obilježenog HAdV26 i $\alpha\beta3$ integrina u klonu A549-E6 (Slika 18). Analizirano je ukupno 59 virusa koji su vezani na površini 9 stanica klona A549-E6. Gotovo 80% HAdV26 kolokalizira s $\alpha\beta3$ integrinom. Ovi rezultati dodatno potvrđuju pretpostavku da je $\alpha\beta3$ integrin receptor za HAdV26 u epitelnim stanicama čovjeka.

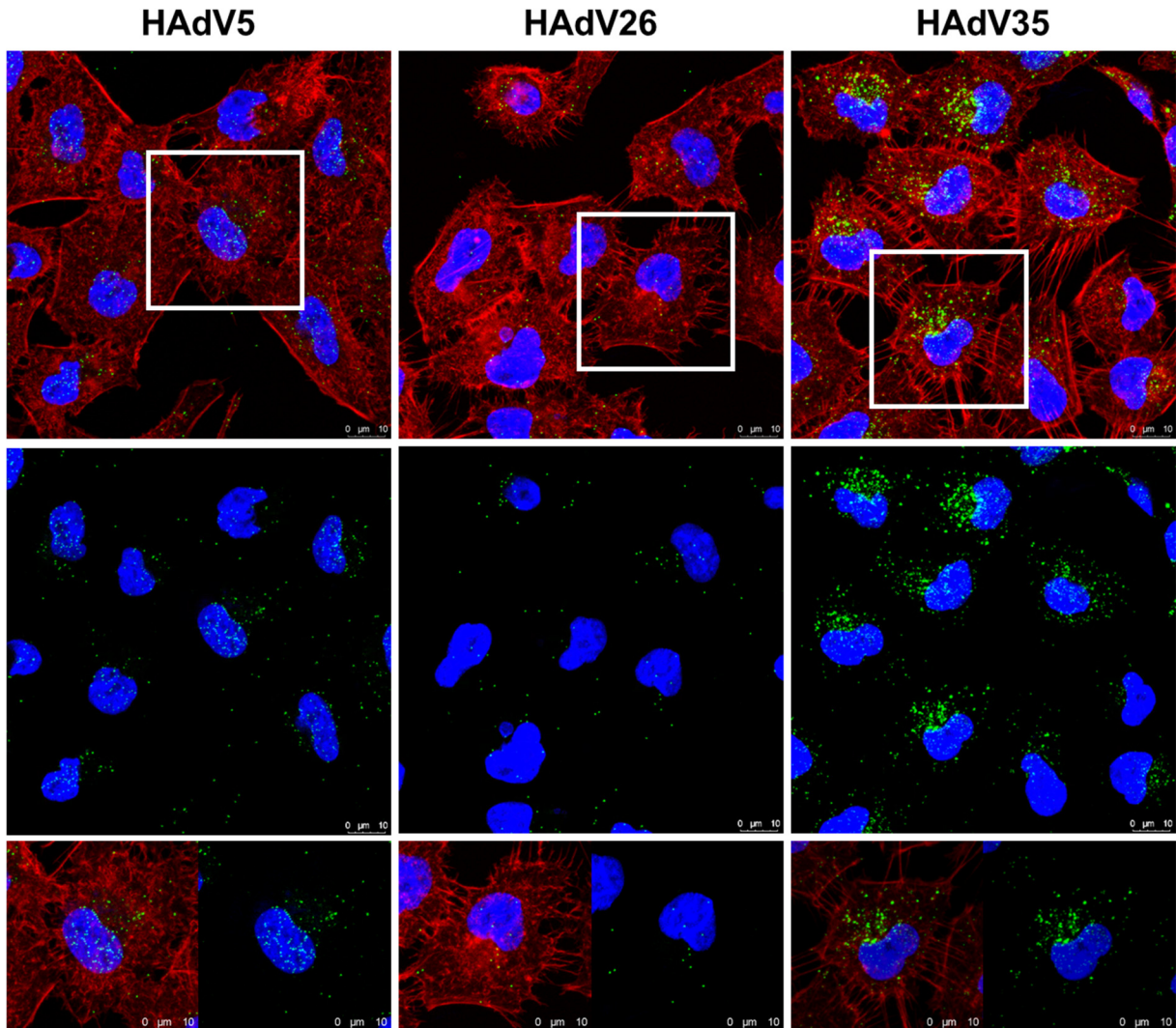


Slika 18. Kolokalizacija HAdV26 s $\alpha\beta3$ integrinom u A549-E6 stanicama (A). Stanice su inkubirane s HAdV26-AF488 (MOI 5×10^4) na ledu tijekom 30 min te potom 1 min pri 37°C , a $\alpha\beta3$ integrin je fluorescentno obilježen korištenjem specifičnog protutijela. Prikazana je reprezentativna slika dobivena konfokalnim mikroskopom. Sive strelice označavaju kolokalizaciju, dok zelene strelice prikazuju odsutnost kolokalizacije. **Kvantifikacija kolokalizacije (B)** pokazuje postotak HAdV26-AF488 koji su kolokalizirali s $\alpha\beta3$ integrinom. Analizirano je 9 stanica inficiranih s 59 adenoviralnih čestica.

4.4. Usporedba unutarstaničnog putovanja HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 staničnoj liniji

Nakon uspješne identifikacije receptora koji je neophodan za uspješnu transdukciju epitelnih stanica s HAdV26, sljedeći korak bio je istražiti kojim tipom endocitoze HAdV26 ulazi u stanice. U tu svrhu u staničnoj liniji A549 konfokalnom mikroskopijom je uspoređeno unutarstanično putovanje fluorescentno obilježenih HAdV26 u odnosu na HAdV5 i HAdV35 (Slika 19). Nakon inkubacije fluorescentno obilježenih HAdV na A549 1 h pri 37°C pokazano je da se većina HAdV5 nalazi u neposrednoj blizini jezgre, HAdV26 je raspršen po stanici dok se HAdV35 uglavnom nalazi grupiran u većem području pokraj jezgre. Pritom HAdV5 i HAdV26 daju jasan točkast signal. Za razliku

od njih, HAdV35 ne daje jasno odvojen točkast signal, već signal čine nakupine i mrlje jačeg ili slabijeg intenziteta.

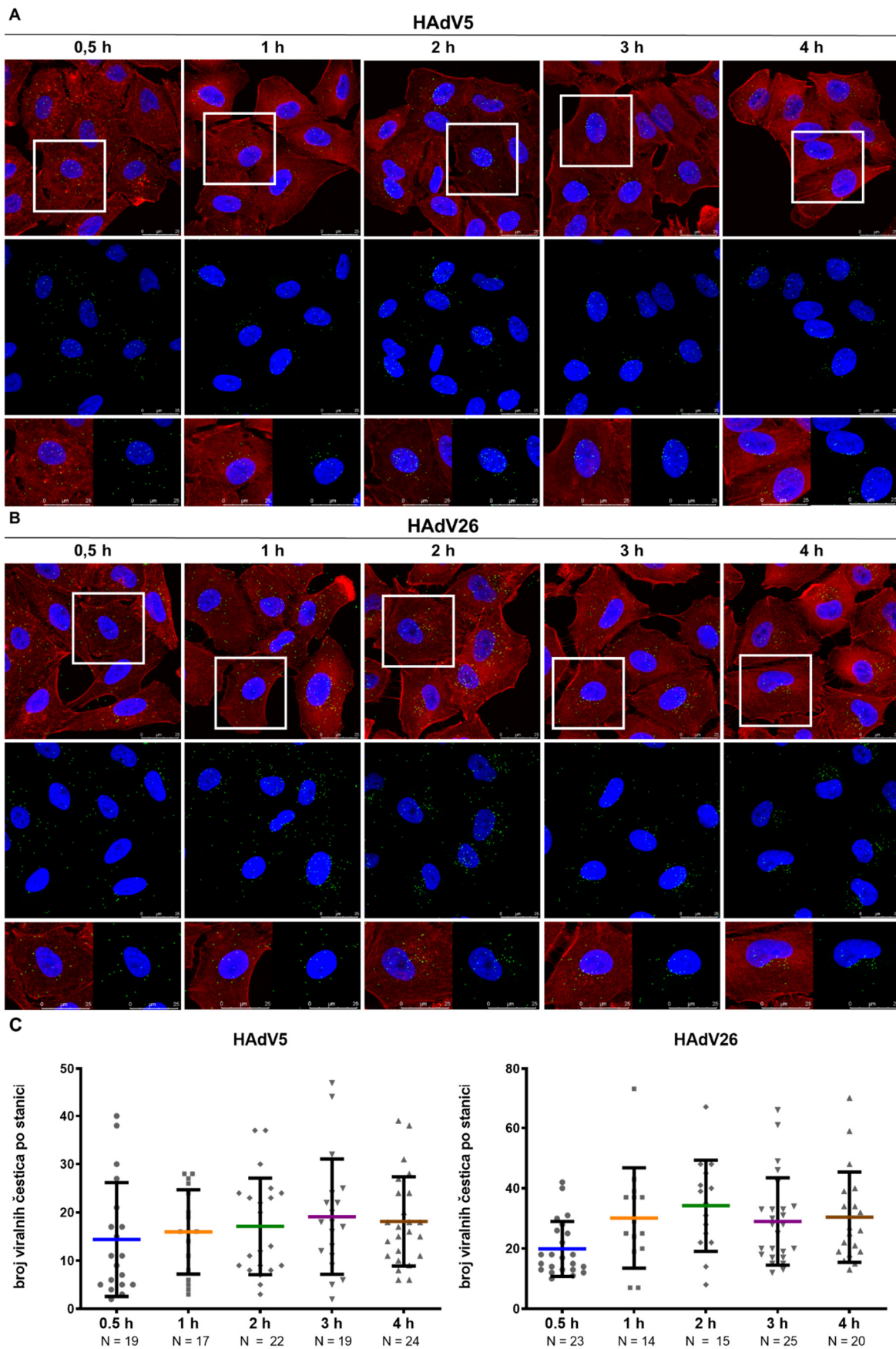


Slika 19. Unutarstanično putovanje HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 staničnoj liniji. Stanice su transducirane s HAdV-AF488 (MOI 10^4). Prikazana su reprezentativna vidna polja. Zeleno – HAdV-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI). Prikazane su maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. Bijeli okvir označava područje koje je uvećano u trećem redu slike.

Analiza unutarstaničnog putovanja pokazuje da se unutar sat vremena HAdV5 već nalazi u neposrednoj blizini jezgre, dok je HAdV26 raspršen po cijeloj citoplazmi stanice, stoga je napravljena usporedba unutarstaničnog putovanja HAdV26 i HAdV5 kroz dulje vremensko razdoblje (Slika 20). Unutarstanični smještaj HAdV26 i HAdV5 promatran je u pet vremenskih točaka: 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h i 4 h nakon što su stanice s

virusima vezanima na površini premještene na 37°C čime se omogućuje njihova endocitoza.

Kod HAdV5 već nakon 1 h većina virusa dođe u blizinu jezgre i tamo se virusi nakupljaju na samoj jezgri, dok se HAdV26 u razdoblju do 1 h nalazi raspršen po stanici, a nakon toga se nalazi u širem perinuklearnom području. Ni nakon 4 h se ne primjećuje povećano nakupljanje HAdV26 u području jezgre, već se većina viralnih čestica nalazi grupirano na jednoj strani u širem perinuklearnom području. Tijekom vremena, prosječan broj viralnih čestica po stanici ostaje isti za oba serotipa HAdV (Slika 20 C).



Slika 20. Unutarstanično putovanje HAdV5 (A) i HAdV26 (B) u A549 tijekom razdoblja od 0.5 h do 4 h. Stanice su s HAdV-AF488 (HAdV5 MOI 5×10^3 , HAdV26 MOI 2×10^4) inkubirane na ledu, a potom

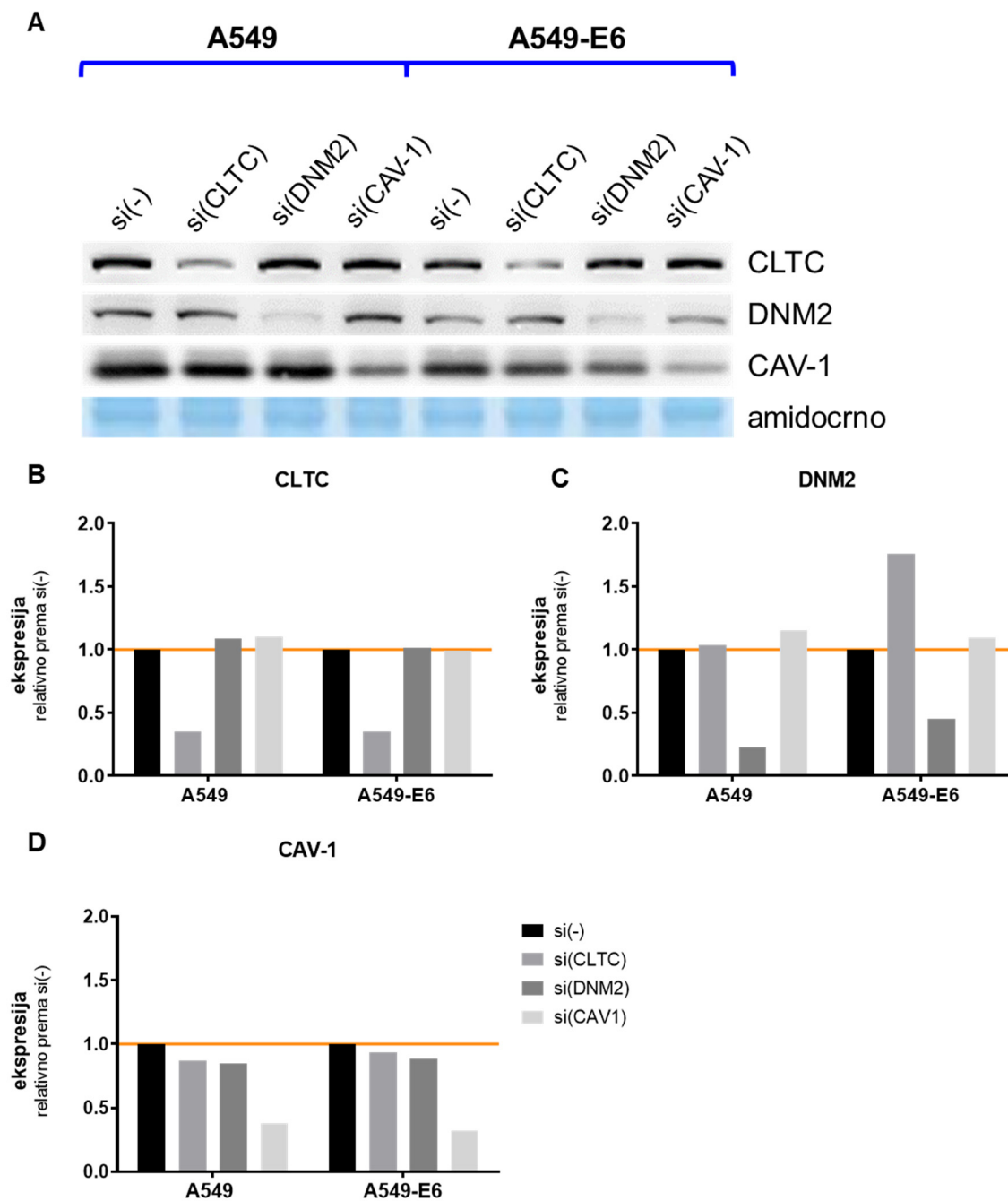
tijekom 0.5 h do 4 h pri 37°C. Prikazana su reprezentativna vidna polja. Zeleno – HAdV-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI). Prikazane su maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. Bijeli okvir označava područje koje je uvećano u trećem redu slika pod A i B. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije virusa (C)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica.

4.5. Uloga dinamina-2, klatrina i kaveolina-1 u uspješnosti transdukcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 i A549-E6 stanicama

S obzirom da je uočeno da se unutarstanično putovanje HAdV26 značajno razlikuje u odnosu na HAdV5 i HAdV35, u nastavku istraživanja istraženo je koju vrstu endocitoze HAdV26 koristi za ulazak u stanice. Endocitoza HAdV26 te HAdV5 i HAdV35 istražena je na staničnoj liniji A549 i klonu A549-E6 koji zbog povećane površinske ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina pokazuje povećanu uspješnost transdukcije s HAdV26 u odnosu na A549 stanice.

U literaturi su klatrinom i kaveolinom posredovane endocitoze opisane kao najčešće receptor-posredovane endocitoze koje adenovirusi koriste za ulazak u stanice (Meier i Greber, 2004). U nastavku istraživanja ispitana je uloga klatrina, kaveolin-1 i dinamina-2, molekula za koje je poznato da su uključene u ulazak adenovirusa u stanicu i to na način da im se smanjila količina u promatranim stanicama. Za utišavanje ovih molekula korištene su specifične siRNA.

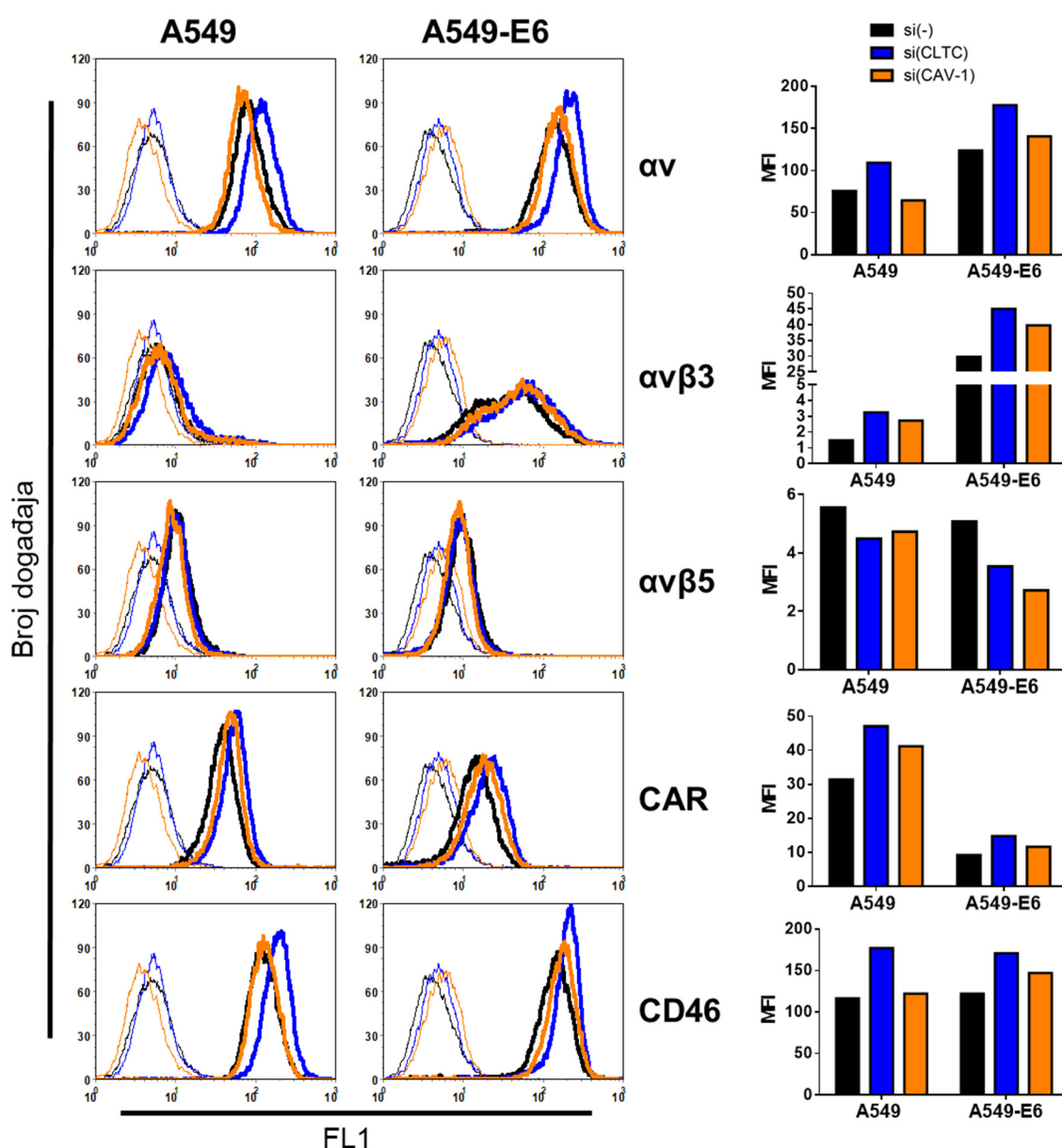
Na Slici 21 se vidi da je utišavanje odabranih proteina u obje stanične linije bilo uspješno i specifično. Nakon utišavanja, razine ekspresije klatrina, dinamina-2 i kaveolina-1 su manje od 50% u odnosu na razine ekspresije navedenih proteina nakon utišavanja s kontrolnom siRNA (si(-)). Pritom utišavanje pojedinog proteina nije promijenilo ekspresiju preostala dva proteina, jedino je utišavanje klatrina pokazalo 1.75 puta povećanu ekspresiju dinamina-2 u klonu A549-E6.



Slika 21. Relativna ekspresija klatrina, dinamina-2 i kaveolina-1 u A549 i A549-E6 stanicama nakon utišavanja specifičnim siRNA. Proteini su utišani korištenjem specifičnih siRNA te razdvojeni SDS-PAGE i analizirani metodom western blot korištenjem specifičnih protutijela. Prikazan je rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima kao kemiluminiscentni signal specifičnih vrpca te signala za bojanje ukupnih proteina (amido-crno) korištenog za normalizaciju (A). Densitometrija za klatrin (CLTC) (B), dinamin-2 (DNM2) (C) te kaveolin-1 (CAV-1) (D) prikazana je relativno u odnosu na si(-).

Korištenje siRNA može izazvati promjene u ekspresiji neciljnih proteina što za posljedicu može imati promjene u vijabilnosti stanica neovisno o promjeni ciljanih proteina (Feodorov i sur., 2006). Također, utišavanje ključnih molekula pojedinog tipa endocitoze može narušiti recikliranje molekula prisutnih na površini stanice (Maxfield i

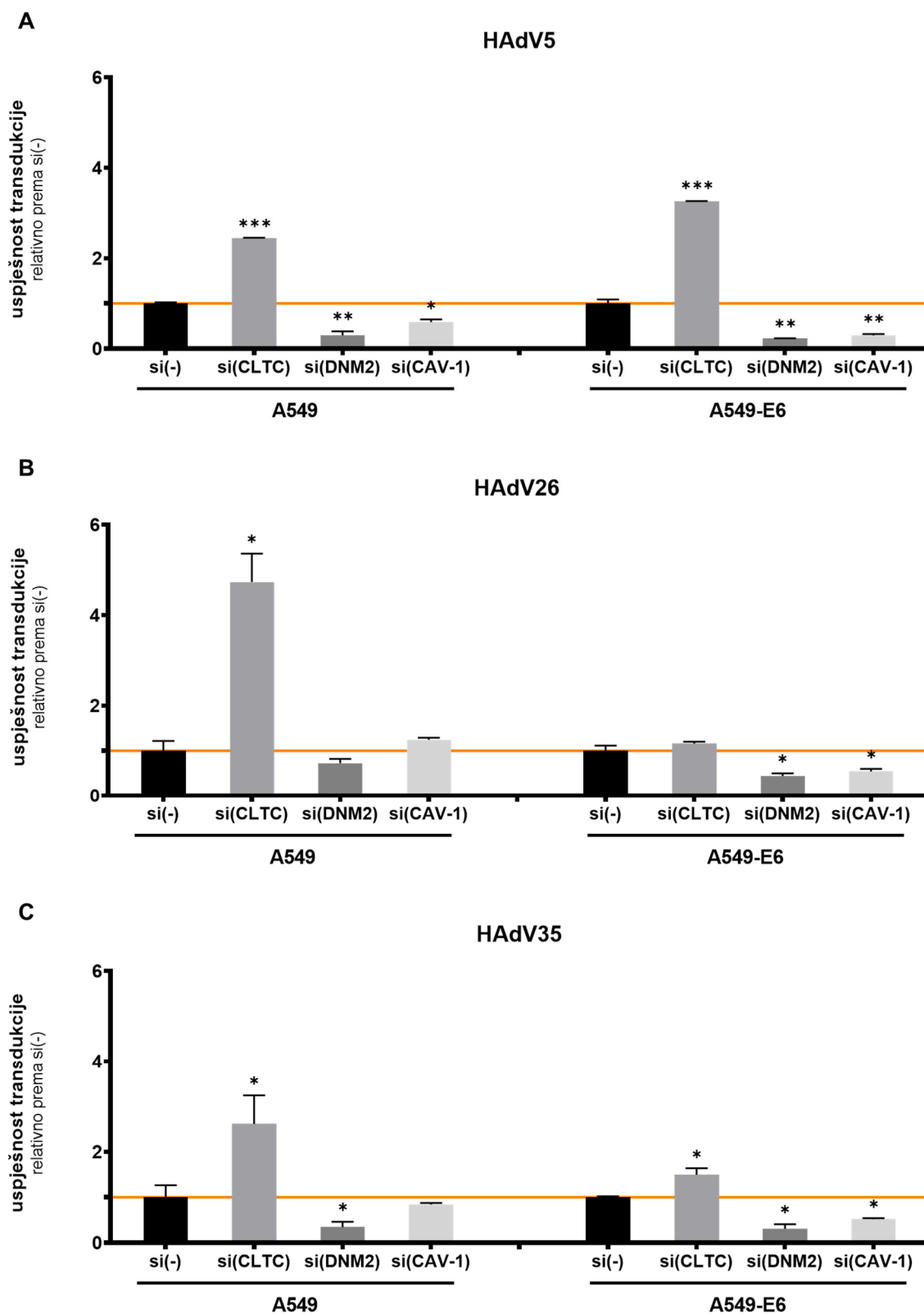
McGraw, 2004) i time promijeniti njihovu količinu na površini stanica. Stoga je istražen utjecaj utišavanja klatrina i kaveolina-1 na površinsku ekspresiju adenoviralnih receptora (Slika 22). Utišavanje klatrina značajno povećava ekspresiju CAR, CD46, αv te $\alpha v\beta 3$ integrina u A549 staničnoj liniji kao i u klonu A549-E6. Količina $\alpha v\beta 5$ integrina na površini stanica nije bitno promijenjena ili je tek nešto smanjena i općenito je niska. Utišavanje kaveolina-1 također povećava količinu CAR i $\alpha v\beta 3$ integrina na površini A549 i A549-E6 stanica, ali manje nego što to povećava utišavanje klatrina. Količina CD46 i αv integrina nije značajno promijenjena nakon utišavanja kaveolina-1, dok je količina $\alpha v\beta 5$ integrina smanjena.



Slika 22. Površinska ekspresija αv , $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ integrina te CAR i CD46 na staničnoj liniji A549 i A549-E6 klonu nakon utišavanja klatrina ili kaveolina-1. Histogrami tankih linija predstavljaju izotipske kontrole, a debljih linija ekspresiju odgovarajućeg proteina za si(-) (crnom bojom), si(CLTC)

(plavom bojom), si(CAV-1) (narančastom bojom). Desno prikazani grafovi su kvantificirani histogrami kao MFI vrijednosti.

Utjecaj utišavanja klatrina, dinamina-2 i kaveolina-1 specifičnim siRNA na endocitozu HAdV5, HAdV26 i HAdV35 određen je mjerenjem uspješnosti transdukcije s navedenim HAdV (Slika 23). Uočeno je da utišavanje svake od ovih molekula ima različit utjecaj na uspješnost transdukcije HAdV5, HAdV26 i HAdV35 što je u nastavku istraživanja detaljnije istraženo. Osim na razini uspješnosti transdukcije koja daje informaciju o količini uspješno dopremljenog genoma HAdV u jezgru stanice, utjecaj utišavanja klatrina, dinamina-2 i kaveolina-1 specifičnim siRNA praćen je i određivanjem broja uspješno internaliziranih fluorescentno obilježenih HAdV5 i HAdV26 u staničnoj liniji A549 (Slike 24, 25, 30).



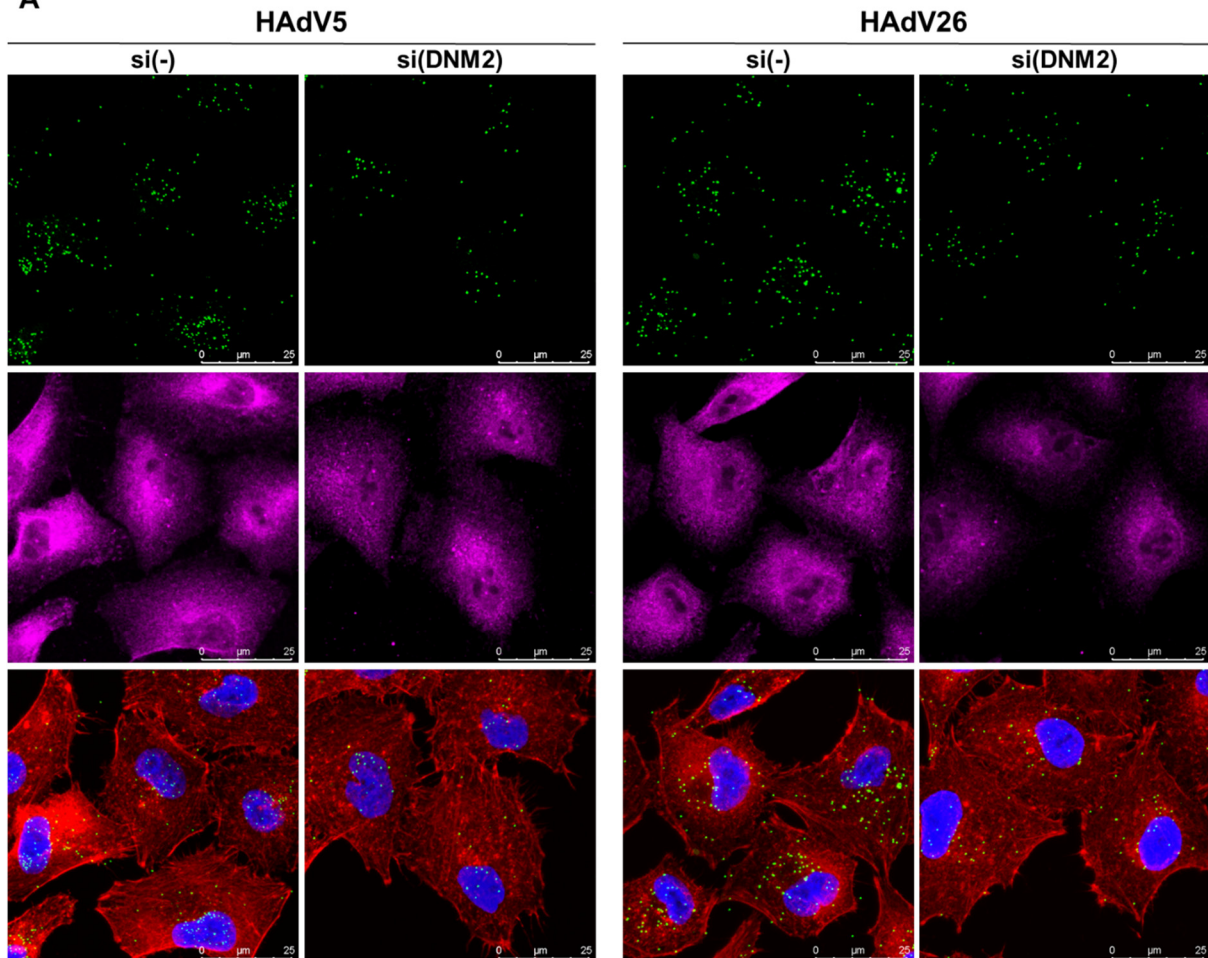
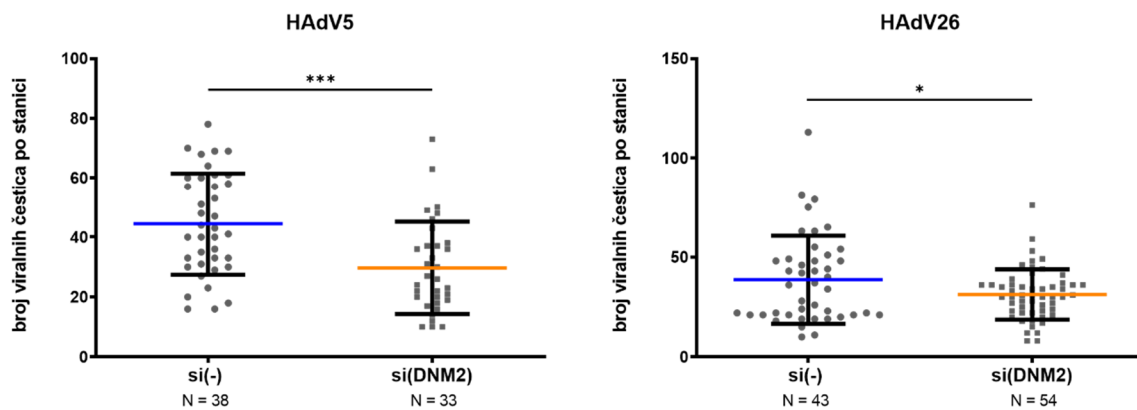
Slika 23. Uspješnost transdukcije A549 i A549-E6 stanica s HAdV5 (A), HAdV26 (B) i HAdV35 (C) nakon utišavanja klatrina (CLTC), dinamina-2 (DNM2) i kaveolina-1 (CAV-1). Stanice su transducirane s HAdV26 (MOI 10⁴) nakon utišavanja proteina korištenjem specifičnih siRNA, a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema si(-) ± SD. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$).**

4.5.1. Utišavanje dinamina-2 smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 u A549 i A549-E6 stanicama te smanjuje broj uspješno internaliziranih HAdV5 i HAdV26 u A549 stanicama

U obje stanične linije, A549 i A549-E6, utišavanje dinamina-2 značajno smanjuje uspješnost transdukcije sva tri ispitana serotipa HAdV, i to HAdV5 3.3 puta u A549 i 4.5 puta u A549-E6, HAdV26 1.4 puta u A549 i 2.3 puta u A549-E6, dok HAdV35 2.9 puta u A549 te 3.3 puta u A549-E6 (Slika 23).

Utišavanje dinamina-2 u A549 staničnoj liniji smanjuje također broj uspješno internaliziranih HAdV5 (1.5 puta) i HAdV26 (1.2 puta), pri čemu značajnije smanjuje internalizaciju HAdV5 što je u skladu s rezultatima uspješnosti transdukcije HAdV5 i HAdV26 nakon utišavanja dinamina-2 (Slika 24).

Ovakvi rezultati upućuju da je endocitoza sva tri ispitana serotipa HAdV u staničnim linijama A549 i A549-E6 ovisna o dinaminu-2.

A**B**

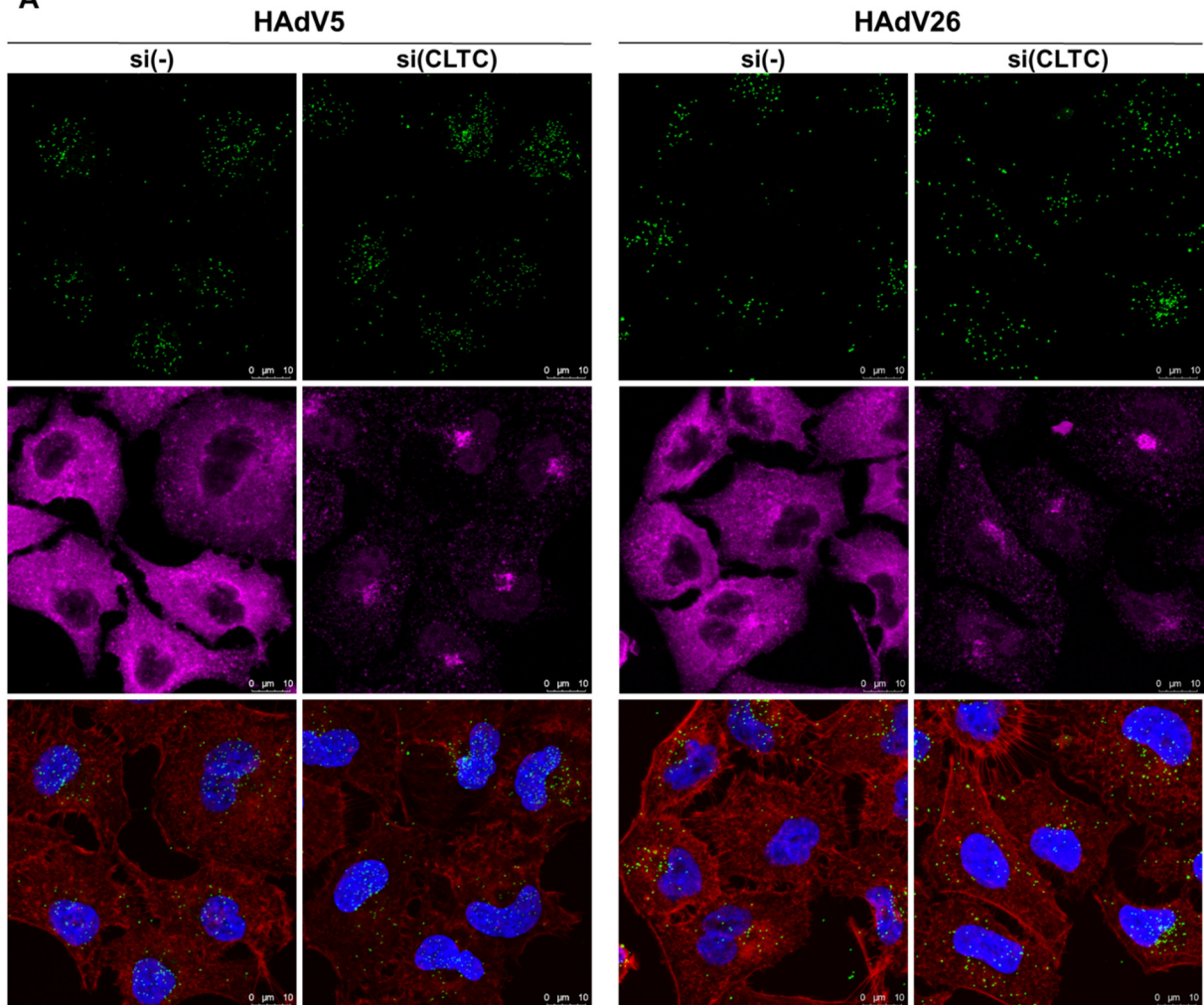
Slika 24. Unutarstanično putovanje HAdV5 i HAdV26 u A549 stanice nakon utišavanja dinamina-2 (A). Stanice su transducirane s HAdV5-AF488 (MOI 5×10^3) ili HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) tijekom 1 h pri 37°C. Korištenjem specifičnih protutijela fluorescentno je obilježen dinamin-2 (DNM2). Zeleno – HAdV5- ili HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI), magenta – DNM2. Prikazane su maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije HAdV5 i HAdV26 u A549 stanice nakon utišavanja dinamina-2 (B)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica. (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

4.5.2. Utišavanje klatrina značajno povećava uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u A549 staničnoj liniji uslijed povećane ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina

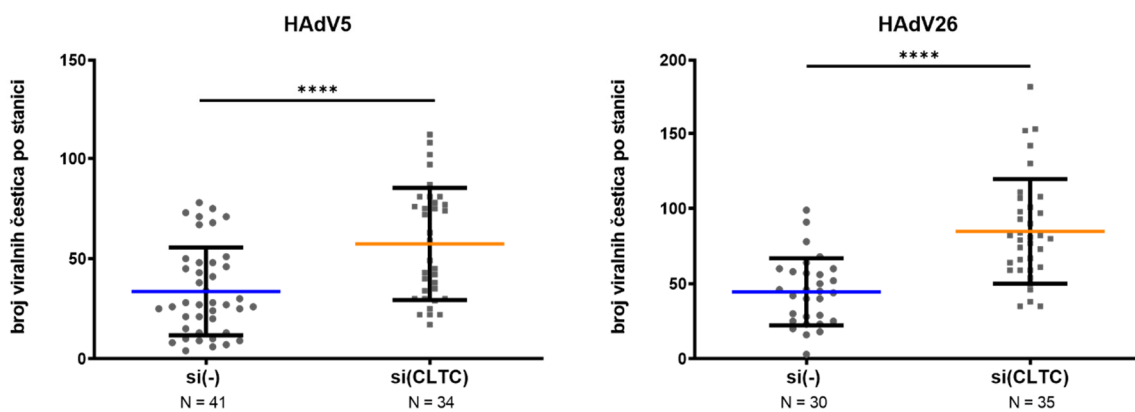
Ispitivanjem uspješnosti transdukcije nakon utišavanje klatrina pokazano je značajno povećanje uspješnosti transdukcije s HAdV26 u A549 stanicama i to 4.7 puta u odnosu na kontrolne stanice (si(-)), dok u klonu A549-E6 utišavanje klatrina ne mijenja uspješnost transdukcije s HAdV26 (Slika 23). Neočekivano, utišavanje klatrina povećava uspješnost transdukcije s HAdV5, 2.4 puta u A549 i 3.2 puta u A549-E6 što nije u skladu s literaturnim podacima gdje je za HAdV5 pokazano da je upravo klatrinom posredovana endocitoza glavni tip endocitoze kojom HAdV5 ulazi u stanice (73, 242). Utišavanje klatrina značajno povećava i uspješnost transdukcije s HAdV35, 2.6 puta u A549 i 1.5 puta u A549-E6. Dakle, smanjenje ekspresije klatrina utišavanjem specifičnom siRNA povećava endocitozu adenovirusa različitih serotipova u staničnoj liniji A549, dok klon A549-E6 s povećanom ekspresijom $\alpha\beta 3$ integrina ne pokazuje povećanu uspješnost transdukcije s HAdV26. Ovakvi rezultati upućuju da promjena u ekspresiji $\alpha\beta 3$ integrina može mijenjati endocitozu HAdV26.

Utišavanjem klatrina povećan je broj uspješno internaliziranih HAdV5 (1.7 puta) i HAdV26 (1.9 puta) u A549 stanicama što je u skladu s uspješnosti transdukcije HAdV5 i HAdV26 nakon utišavanja klatrina (Slika 25).

A



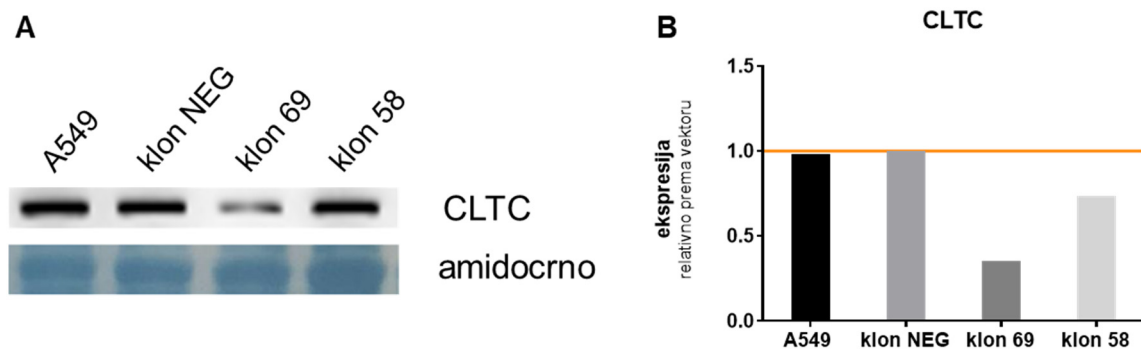
B



Slika 25. Unutarstanično putovanje HAdV5 i HAdV26 u A549 stanice nakon utišavanja klatrina (A). Stanice su transducirane s HAdV5-AF488 (MOI 5×10^3) ili HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) tijekom 1 h pri 37°C . Korištenjem specifičnih protutijela fluorescentno je obilježen klatrin (CLTC). Zeleno – HAdV5-ili HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI), magenta – CLTC. Prikazane su maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije HAdV5 i HAdV26 u A549 stanice nakon utišavanja klatrina (B)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica. (**** $P < 0,0001$).

S obzirom da su količine primarnog receptora CAR te sekundarnog receptora $\alpha\beta 3$ integrina za HAdV5, $\alpha\beta 3$ integrina za HAdV26 te CD46 za HAdV35 značajno povećane nakon utišavanja klatrina, pretpostavljeno je da je upravo to povećanje količine dostupnih receptora na površini stanica razlog povećane transdukcije i internalizacije za sva tri serotipa HAdV nakon utišanja klatrina (Slika 22).

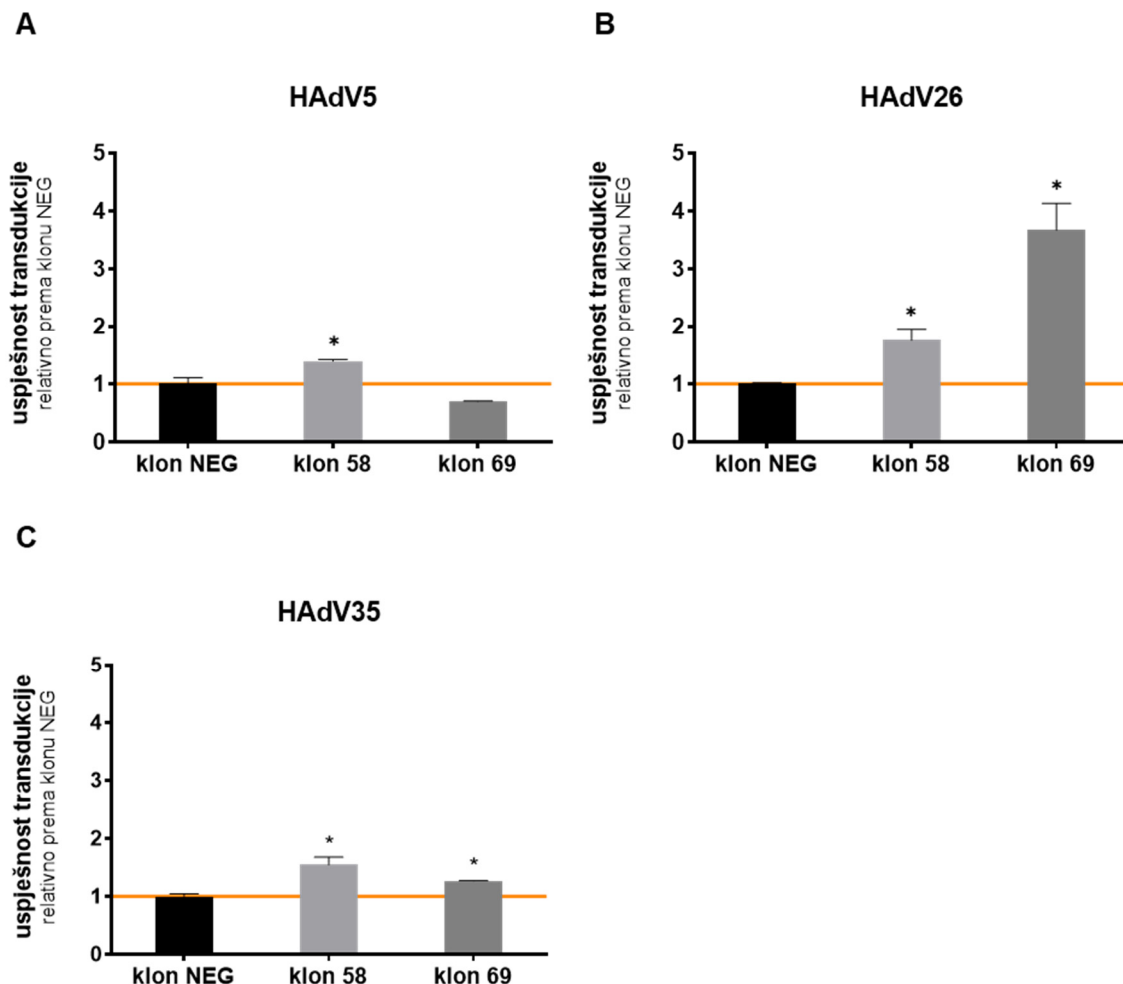
Rezultati dobiveni korištenjem siRNA dodatno su potvrđeni korištenjem klonova sa stabilno utišanim klatrinom. Transfekcijom A549 stanica s plazmidom pl(vektor) izdvojen je kontrolni klon (klon NEG), a transfekcijom s plazmidom pl(shCLTC) izdvojena su dva klona A549 stanica sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina (A549-shCLTC klonovi): klon 58 i klon 69. Količina klatrina u klonu NEG jednaka je kao i u A549 stanicama što pokazuje da transfekcijom s plazmidom pl(vektor) kao negativnom kontrolom nije promijenjena ekspresija klatrina. U odnosu na klon NEG, klon 58 ima 77%, a klon 69 37% ekspresije klatrina (Slika 26).



Slika 26. Ekspresija klatrina (CLTC) u staničnoj liniji A549, klonu NEG i A549-shCLTC klonovima. Proteini su razdvojeni SDS-PAGE i analizirani metodom western blot korištenjem specifičnog protutijela koje prepoznaje klatrin. Prikazan je rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima kao kemiluminiscentni signal specifične vrpce za klatrin te signala za bojanje ukupnih proteina (amidocrno) korištenog za normalizaciju (A). Densitometrija za klatrin prikazana je relativno u odnosu na klon NEG (B).

Stabilno utišavanje klatrina značajno povećava uspješnost transdukcije s HAdV26 i to obrnuto proporcionalno s količinom klatrina koju klonovi ekspimiraju. Tako je kod klona 58 uspješnost transdukcije s HAdV26 povećana 1.7 puta, a kod klona 69 3.7 puta u odnosu na klon NEG. Zanimljivo, u klonu 58 je blago povećana i uspješnost transdukcije s HAdV5 (1.4 puta) i HAdV35 (1.5 puta), dok je u klonu 69 uspješnost transdukcije s HAdV5 blago smanjena (1.4 puta), a kod HAdV35 blago povećana (1.3 puta) u odnosu na uspješnost transdukcije klona NEG (Slika 27). Ovakvi rezultati u

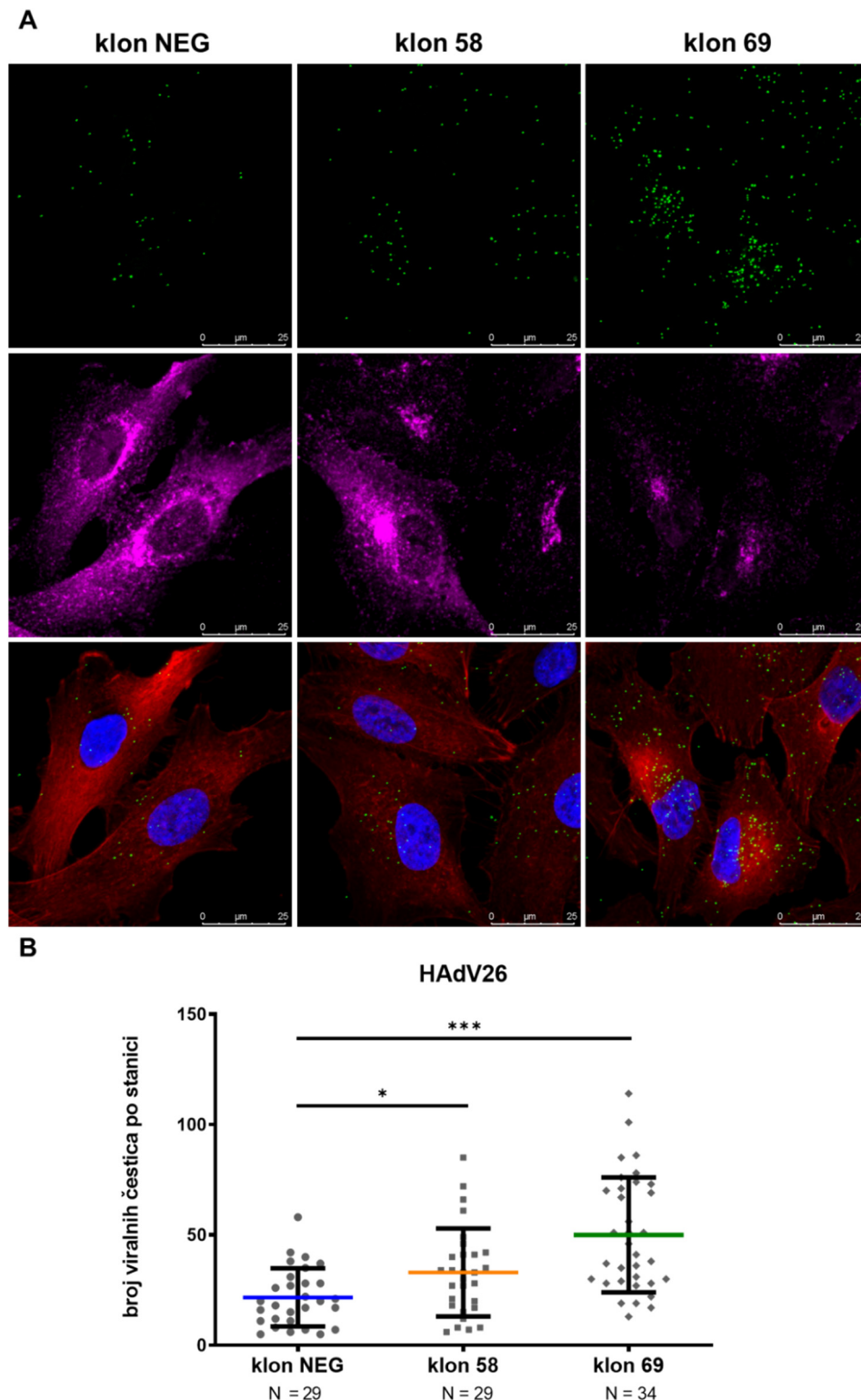
skladu su s povećanjem uspješnosti transdukcije s HAdV26 i HAdV35 nakon utišavanja klatrina korištenjem specifičnih siRNA. Uspješnost transdukcije s HAdV5 kod klona 58 pokazuje isti, a kod klona 69 suprotni učinak u odnosu na uspješnost transdukcije s HAdV5 nakon prolaznog utišavanja klatrina korištenjem specifične siRNA.



Slika 27. Transdukcija klona NEG i A549-shCLTC klonova s HAdV5 (A), HAdV26 (B) i HAdV35 (C). Stanice su transducirane s HAdV (MOI 10^4), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema klonu NEG \pm SD. (* $P < 0,05$).

U skladu s uspješnosti transdukcije, broj uspješno internaliziranih fluorescentno obilježenih HAdV26 povećan je u oba A549-shCLTC klona u odnosu na klon NEG, 2.3 puta u klonu 69 koji ima nižu ekspresiju klatrina te 1.5 puta u klonu 58. Također, prema intenzitetu fluorescencije signala klatrina jasno je vidljivo smanjenje u ekspresiji

klatrina u klonovima 58 i 69. Signal klatrina je u odnosu na klon NEG smanjen kod klona 58, a gotovo dokinut kod klona 69 (Slika 28).

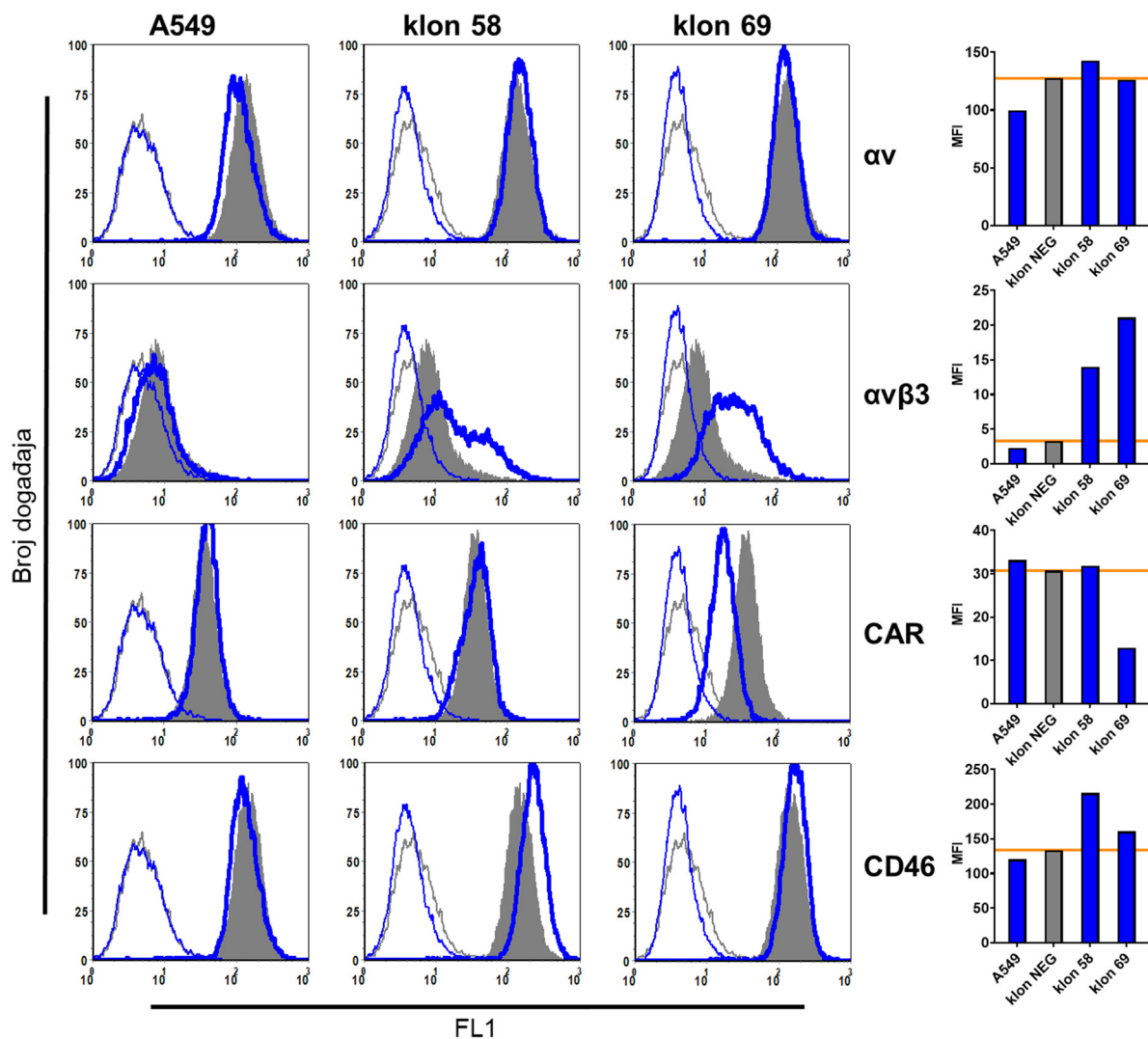


Slika 28. Unutarstanično putovanje HAdV26 u klonu NEG i A549-shCLTC klonovima (A). Stanice su transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) tijekom 1 h pri 37°C. Korištenjem specifičnih protutijela fluorescentno je obilježen klatrin. Zeleno – HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI), magenta – klatrin. Prikazana su reprezentativna vidna polja kao maksimalne projekcije

konfokalnih snimaka po slojevima. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije virusa (B)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica. (* $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$).

Utišavanje klatrina korištenjem specifične siRNA povećava ekspresiju CAR, CD46, α v te α v β 3 integrina u A549 stanicama što omogućuje povećanu uspješnost transdukcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35. Kako je i stabilnim utišavanjem klatrina primjećen isti učinak povećanja uspješnosti transdukcije adenovirusa, ispitana je ekspresija adenoviralnih receptora u klonu NEG i klonovima 58 i 69 kao i roditeljskim A549 stanicama (Slika 29). Ekspresija navedenih receptora je usporediva u klonu NEG i roditeljskim A549 stanicama što znači da sama transfekcija nije utjecala na ekspresiju CAR, CD46, α v te α v β 3 integrina. U odnosu na klon NEG u oba klona sa stabilno utišanim klatrinom značajno je povećana količina α v β 3 integrina te blago povećana količina CD46. To povećanje količine α v β 3 integrina u skladu je s povećanjem uspješnosti transdukcije i internalizacije HAdV26, dok je povećanje količine CD46 u skladu s povećanjem uspješnosti transdukcije s HAdV35. Klon 58 nema promijenjenu količinu CAR, dok klon 69 ima smanjenu količinu ekspresije CAR u odnosu na klon NEG. Navedeno smanjenje u skladu je sa smanjenom uspješnosti transdukcije s HAdV5 u klonu 69.

Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da su promjene u uspješnosti transdukcije ili internalizacije adenovirusa nakon utišavanja klatrina posljedica promjena u ekspresiji receptora (CAR, CD46 te α v β 3 integrina).

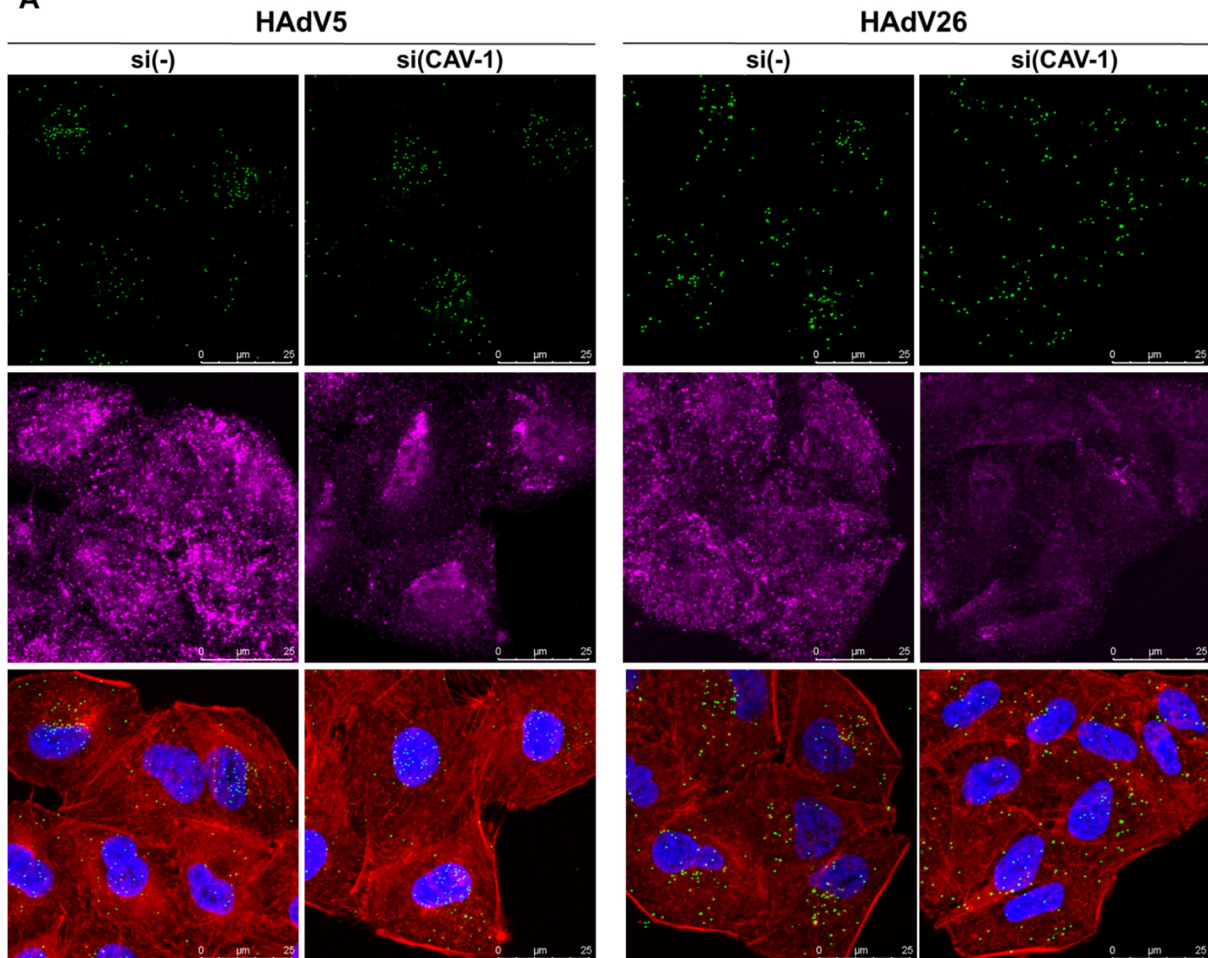
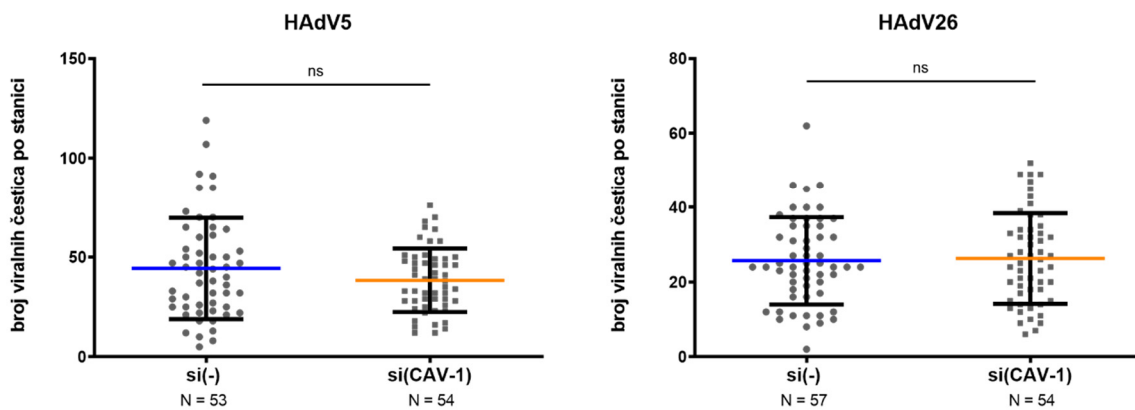


Slika 29. Površinska ekspresija αv i $\alpha v\beta 3$ integrina, CAR i CD46 na staničnoj liniji A549, klonu NEG i A549-shCLTC klonovima. Histogrami tankih linija predstavljaju izotipske kontrole za klon NEG (sivom bojom) i A549 ili odgovarajući A549-CLTC klon (plavom bojom), sivo ispunjeni histogrami predstavljaju odgovarajući protein u klonu NEG, a histogrami označeni debljom plavom linijom predstavljaju ekspresiju odgovarajućeg proteina u pojedinom A549 ili pojedinom A549-shCLTC klonu. Desno prikazani grafovi su kvantificirani histogrami kao MFI vrijednosti i uspoređeni po odgovarajućim proteinima za A549 i A549-shCLTC klonove u odnosu na klon NEG. Narančasta linija predstavlja ekspresiju pojedinog ispitivanog proteina u klonu NEG.

4.5.3. Utišavanje kaveolina-1 ne mijenja značajno uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u A549 staničnoj liniji unatoč povećanoj ekspresiji $\alpha\beta 3$ integrina, ali smanjuje uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u klonu A549-E6

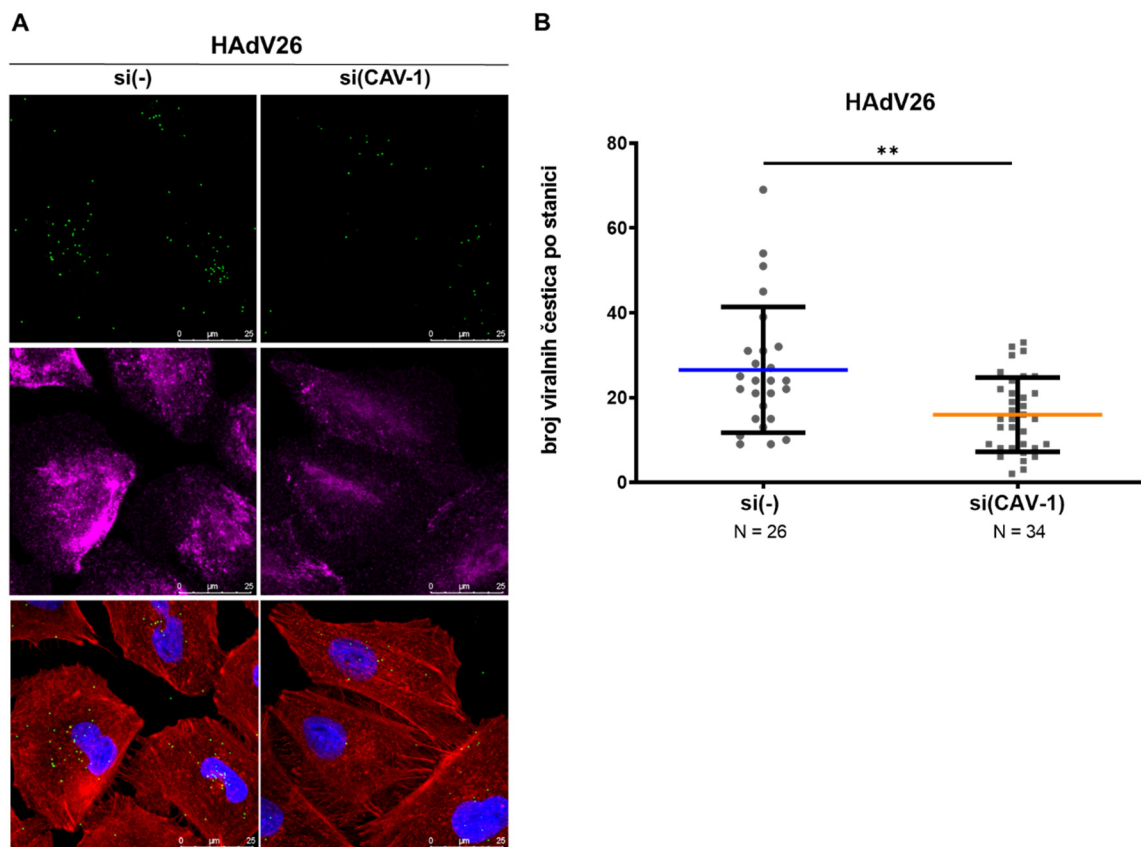
U staničnoj liniji A549 utišavanje kaveolina-1 smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV5 (1.7 puta), blago povećava uspješnost transdukcije s HAdV26 (1.2 puta), a nema utjecaj na uspješnost transdukcije s HAdV35. U klonu A549-E6 uspješnost transdukcije je nakon utišavanja kaveolina-1 smanjena kod sva tri serotipa HAdV: 3.4 puta kod HAdV5, 1.9 puta kod HAdV26 te 2 puta kod HAdV35, što upućuje na moguću povezanost povećane ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina i endocitoze HAdV posredovane kaveolinom-1 (Slika 23).

Utišavanjem kaveolina-1 nije se promijenio broj uspješno internaliziranih HAdV5 i HAdV26 (Slika 30). Za HAdV26 to je u skladu s uspješnosti transdukcije nakon utišavanja kaveolina-1, ali ne i kod HAdV5 gdje je uspješnost transdukcije niža nakon utišavanja kaveolina-1. Međutim, određivanje broja čestica HAdV koji su uspješno internalizirali u stanice ne daje podatak o uspješnom unosu genoma u jezgru. Moguće je da utišavanje kaveolina-1 ne mijenja broj čestica HAdV5 koje su uspješno internalizirale u stanicu, ali ima utjecaj na njihovo uspješno putovanje prema jezgri i/ili uspješno dopremanje viralne DNA u jezgri stanice.

A**B**

Slika 30. Unutarstanično putovanje HAdV5 i HAdV26 u A549 stanice nakon utišavanja kaveolina-1 (A). Stanice su transducirane s HAdV5-AF488 (MOI 5×10^3) ili HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) tijekom 1 h pri 37°C. Korištenjem specifičnih protutijela fluorescentno je obilježen kaveolin-1 (CAV-1). Zeleno – HAdV5- ili HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI), magenta – CAV-1. Prikazane su maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije HAdV5 i HAdV26 u A549 stanice nakon utišavanja kaveolina-1 (B)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica.

Kako je pokazano da utišavanje kaveolina-1 nema utjecaj na uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u A549 stanicama, a smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV26 u klonu A549-E6, određen je broj uspješno internaliziranih fluorescentno obilježenih HAdV26 u klonu A549-E6 nakon utišavanja kaveolina-1 (Slika 31). Utišavanje kaveolina-1 značajno je smanjilo internalizaciju HAdV26 u A549-E6. Prosječan broj viralnih čestica po stanici smanjen je s 27 kod si(-) na 16 kod si(CAV-1). Ovakav rezultat upućuje na moguću povezanost $\alpha\beta 3$ integrina i kaveolinom-1 posredovane endocitoze u uspješnoj internalizaciji HAdV26.

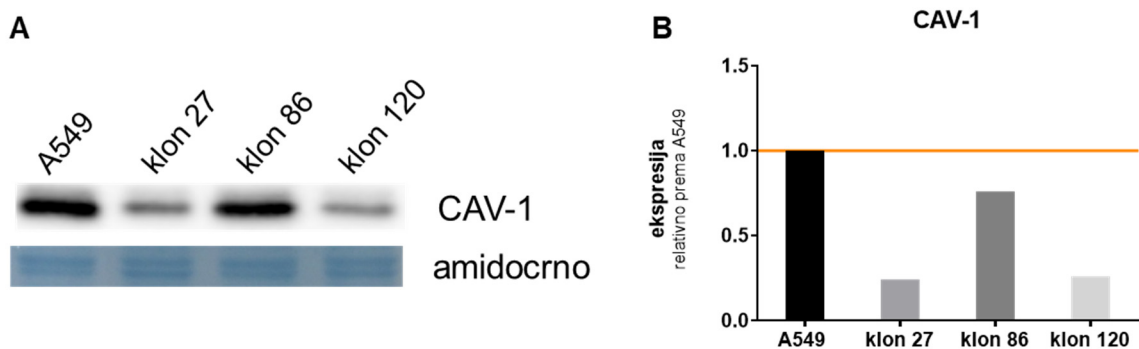


Slika 31. Unutarstanično putovanje HAdV26 u A549-E6 stanice nakon utišavanja kaveolina-1 (A). Stanice su transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 5×10^4) tijekom 1 h pri 37°C . Korištenjem specifičnih protutijela fluorescentno je obilježen kaveolin-1 (CAV-1). Zeleno – HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI), magenta – CAV-1. Prikazana su reprezentativna vidna polja kao maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije HAdV26 nakon utišavanja kaveolina-1 (B)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica. (** $P < 0,01$).

Kao i kod utišavanja klatrina, utišavanje kaveolina-1 također povećava ekspresiju $\alpha\beta 3$ integrina, ali manje nego utišavanje klatrina. Pritom utišavanje kaveolina-1 ne mijenja uspješnost transdukcije s HAdV26 u A549 stanicama te smanjuje uspješnost

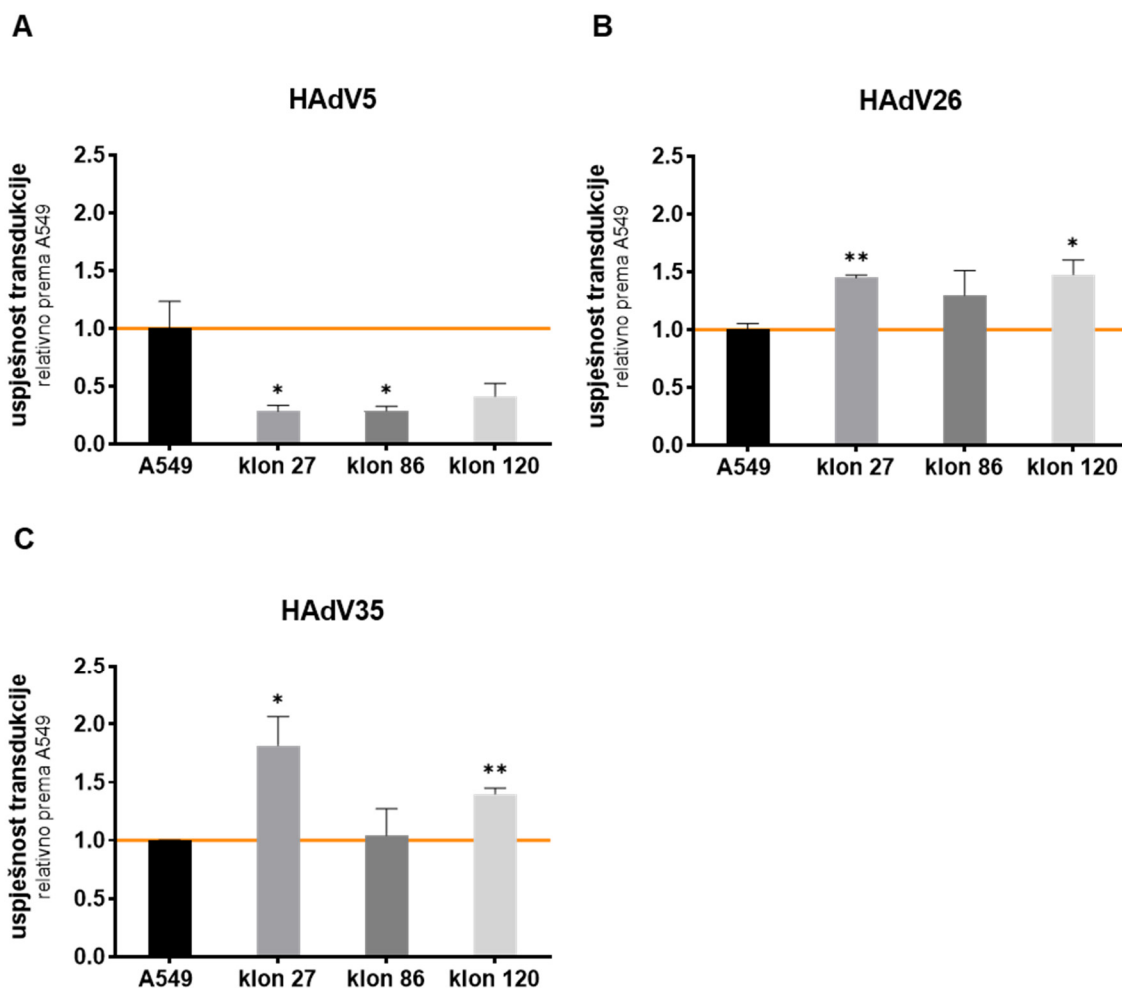
transdukcije s HAdV26 u klonu A549-E6, što upućuje da bi kaveolin-1 mogao biti nužan za uspješnu transdukciju posredovanu $\alpha\beta 3$ integrinom.

S obzirom da je utišavanje kaveolina-1 u A549 stanicama i A549-E6 klonu s povećanom ekspresijom $\alpha\beta 3$ integrina pokazalo promjene u infekciji s adenovirusima, rezultati dobiveni korištenjem siRNA dodatno su potvrđeni korištenjem klonova sa stabilno utišanim kaveolinom-1. Prethodno su u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala izdvojeni klonovi stanične linije A549 sa stabilno smanjenom ekspresijom kaveolina-1 (A549-shCAV-1): klon 27, klon 86 i klon 120. Ekspresija kaveolina-1 u A549-shCAV-1 klonovima u odnosu na roditeljske A549 stanice prikazana je na Slici 32. Klon 27 ima 24%, klon 86 76%, a klon 120 26% ekspresije kaveolina-1 u odnosu na A549 stanice.



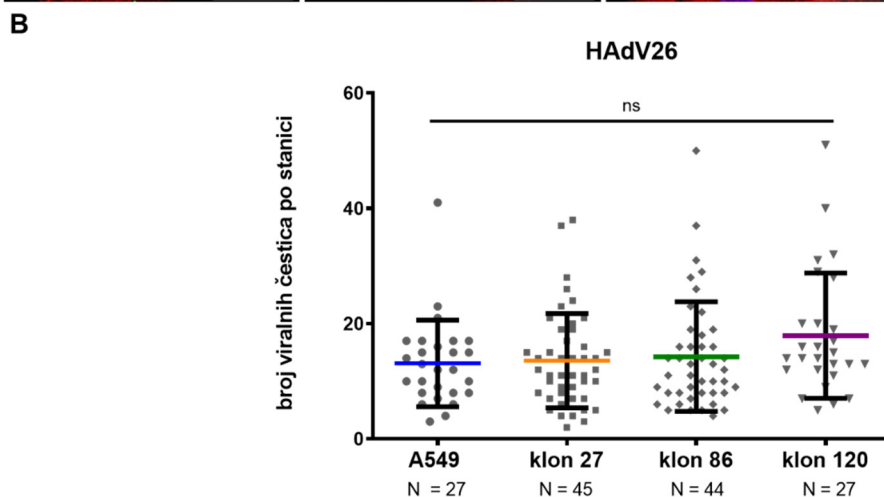
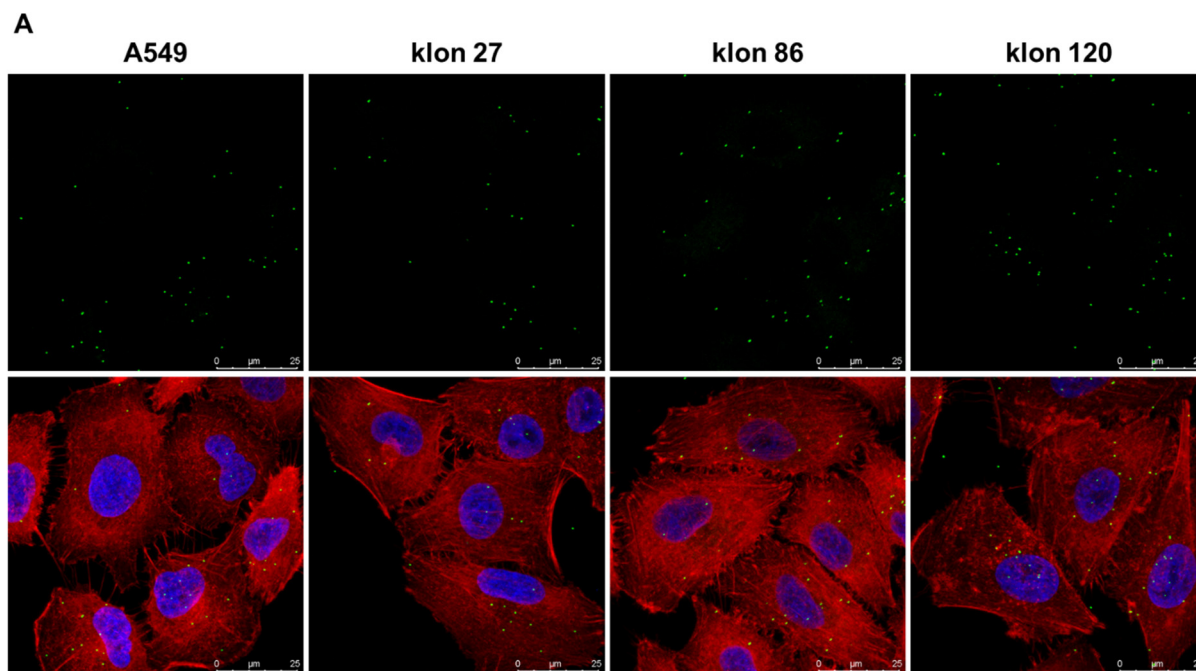
Slika 32. Ekspresija kaveolina-1 (CAV-1) u staničnoj liniji A549 i A549-shCAV-1 klonovima. Proteini su razdvojeni SDS-PAGE i analizirani metodom western blot korištenjem specifičnog protutijela koje prepoznaje kaveolin-1 (CAV-1). Prikazan je rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima kao kemiluminiscentni signal specifične vrpce za kaveolin-1 te signala za bojanje ukupnih proteina (amidocrno) korištenog za normalizaciju (A). Densitometrija za kaveolin-1 prikazana je relativno u odnosu na A549 (B).

A549-shCAV-1 klonovi pokazuju smanjenu uspješnost transdukcije s HAdV5 za više od 50%, dok je uspješnost transdukcije s HAdV26 i HAdV35 nepromijenjena ili povećana do 1.5 puta (Slika 33). Ovakvi rezultati su u skladu s rezultatima utišavanja kaveolina-1 korištenjem specifičnih siRNA gdje utišavanje kaveolina-1 smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV5, a neznatno utječe na uspješnost transdukcije s HAdV26 i HAdV35 (Slika 23).



Slika 33. Uspješnost transdukcije A549 stanica i A549-shCAV-1 klonova s HAAdV5 (A), HAAdV26 (B) i HAAdV35 (C). Stanice su transducirane s HAAdV (MOI 10^4), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema A549 \pm SD. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

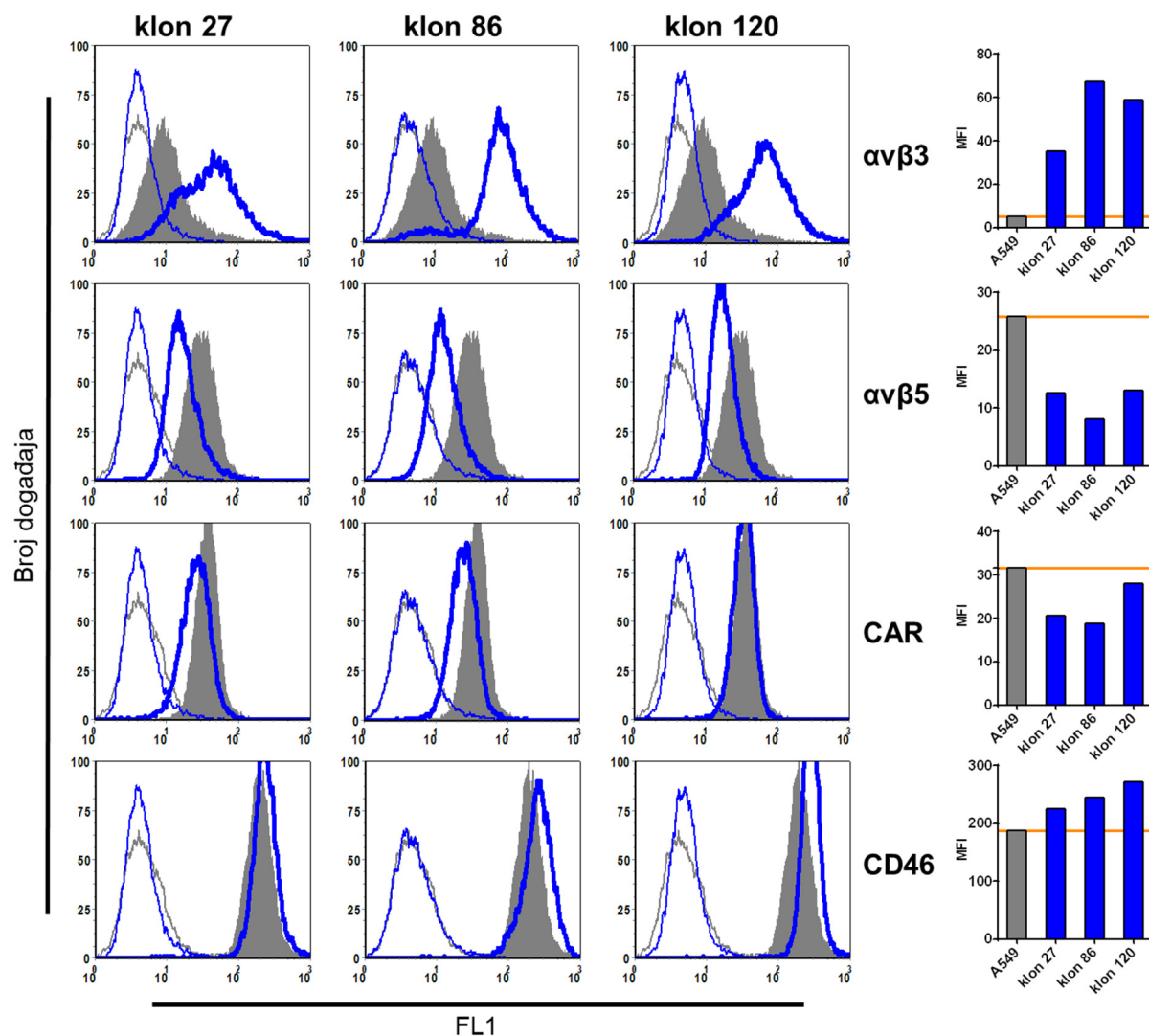
Broj uspješno internaliziranih fluorescentno obilježenih HAAdV26 određen je u sva tri klona sa stabilno utišanim kaveolinom-1 i pokazano je da nema promjene u broju čestica HAAdV26 koje su uspješno internalizirale u klonove sa stabilno utišanim kaveolinom-1 u odnosu na A549 staničnu liniju (Slika 34), za razliku od uspješnosti transdukcije s HAAdV26 koja je u klonovima 27 i 120 blago povećana.



Slika 34. Unutarstanično putovanje HAdV26 u A549 i A549-shCAV-1 klonove (A). Stanice su transducirane s HAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) tijekom 1 h pri 37°C. Zeleno – HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI). Prikazana su reprezentativna vidna polja kao maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije virusa (B)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica.

Ekspresija adenoviralnih receptora nakon stabilnog utišavanja kaveolina-1 pokazala je da je u A549-shCAV-1 klonovima ekspresija CAR i CD46 značajno smanjena, a ekspresija $\alpha\beta3$ integrina jako povećana u odnosu na A549 stanice. Ekspresija $\alpha\beta5$ integrina je smanjena u sva tri A549-shCAV-1 klona u odnosu na A549 (Slika 35). Smanjenje količine CAR je u skladu sa smanjenom uspješnosti transdukcije s HAdV5 u stabilnim klonovima s utišanim kaveolinom-1, dok smanjenje količine CD46 ne

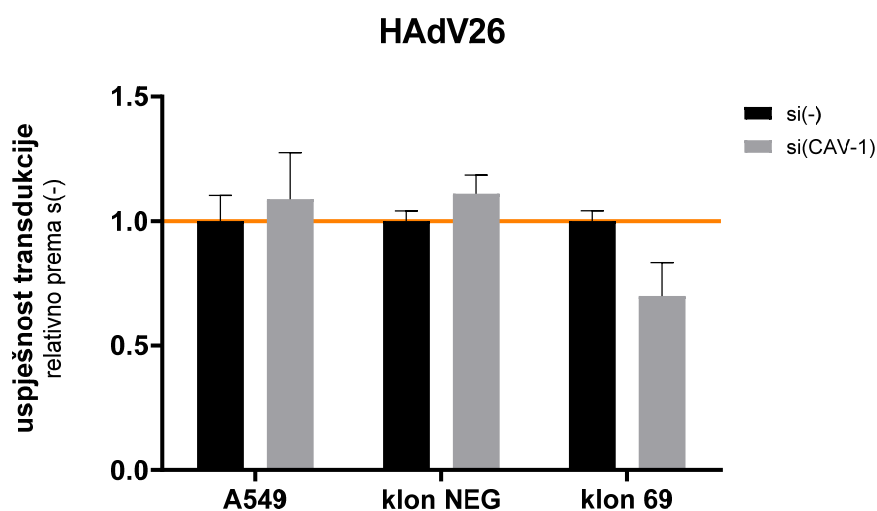
uzrokuje smanjenu uspješnost transdukcije s HAdV35. Zanimljivo, jako povećanje ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina u A549-shCAV-1 klonovima ne uzrokuje povećanje uspješnosti transdukcije s HAdV26. Ovakav rezultat dodatno upućuje da bi ulazak HAdV26 u stanicu pomoću $\alpha\beta 3$ integrina mogao biti ovisan o kaveolinom-1 posredovanoj endocitozi.



Slika 35. Površinska ekspresija $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ integrina, CAR i CD46 na staničnoj liniji A549 i A549-shCAV-1 klonovima. Histogrami tankih linija predstavljaju izotipske kontrole za A549 (sivom bojom) i odgovarajući A549-shCAV-1 klon (plavom bojom), sivo ispunjeni histogrami predstavljaju odgovarajući protein u A549, a histogrami označeni debljom plavom linijom predstavljaju ekspresiju odgovarajućeg proteina u pojedinom A549-shCAV-1 klonu. Desno prikazani grafovi su kvantificirani histogrami kao MFI vrijednosti i uspoređeni po odgovarajućim proteinima za A549-shCAV-1 klonove u odnosu na staničnu liniju A549. Narančasta linija predstavlja ekspresiju pojedinog ispitivanog proteina u A549 stanicama.

4.5.4. Utišavanje kaveolina-1 u klonu 69 sa stabilno utišanim klatrinom smanjuje povećanu uspješnost transdukcije s HAdV26

Dosadašnjim rezultatima pokazano je da utišavanjem klatrina korištenjem specifičnih siRNA te kod klonova sa stabilno utišanim klatrinom dolazi do povećanja uspješnosti transdukcije s HAdV26 uslijed povećanja površinske ekspresije receptora $\alpha\beta3$ integrina. Postavlja se pitanje usmjerava li povećana ekspresija $\alpha\beta3$ integrina endocitozu HAdV26 na kaveolin-1 posredovani put. Naime, pokazano je da smanjenje ekspresije kaveolina-1 pomoću specifične siRNA smanjuje uspješnost transdukcije i internalizacije s HAdV26 u klonu A549-E6 koji ima povećanu ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina, dok ne mijenja uspješnost transdukcije i internalizacije u A549 stanicama koje imaju nižu ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina. Zbog toga je u klonu 69 sa stabilno utišanim klatrinom nakon utišavanja kaveolina-1 korištenjem specifične siRNA određena uspješnost transdukcije s HAdV26 (Slika 36). U A549 stanicama i klonu NEG koji imaju samo utišan kaveolin-1 transdukcija se ne mijenja, dok je u odnosu na njih uspješnost transdukcije s HAdV26 smanjena 30% u klonu 69 koji ima utišan i klatrin i kaveolin-1. Ovakvi rezultati upućuju da $\alpha\beta3$ integrin usmjerava HAdV26 na kaveolinom-1-posredovanu endocitozu.



Slika 36. Uspješnost transdukcije A549 stanica, klona NEG i klona 69 s HAdV26 nakon utišavanja kaveolina-1. Stanice su transducirane s HAdV26 (MOI 10^4), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema $si(-) \pm SD$.

4.6. Inhibicija klatrinom posredovane endocitoze korištenjem inhibitora pitstop 2 u A549 i A549-E6 staničnim linijama utječe na povećanje infekcije s HAdV26

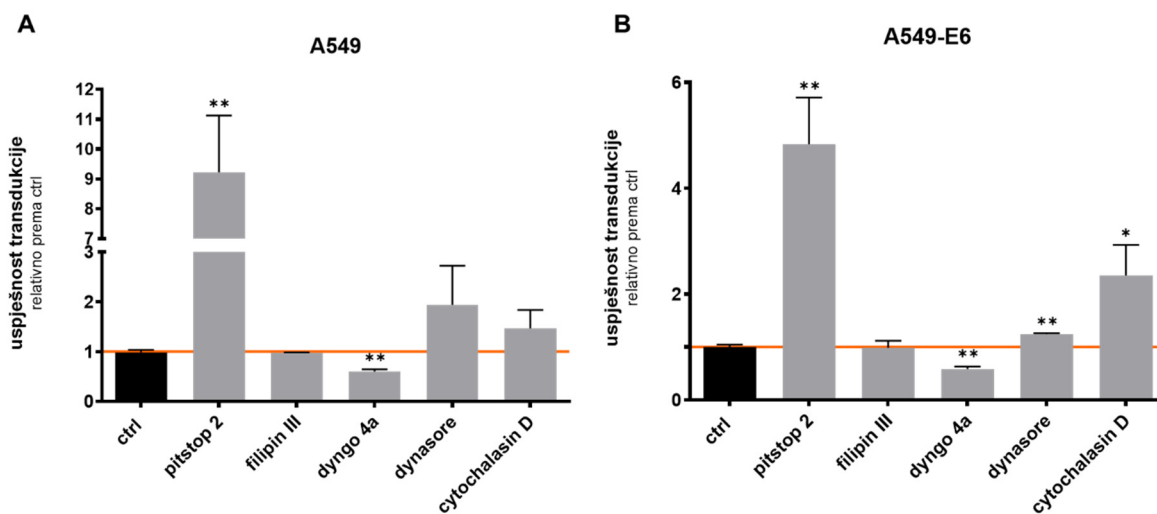
Osim promjenom ekspresije proteina od interesa uključenog u ulazak adenovirusa u stanice, utjecaj pojedinog tipa endocitoze na uspješnost transdukcije s HAdV26 u A549 i A549-E6 stanice je ispitan korištenjem kemijskih inhibitora čije je djelovanje opisano u Tablici 19. Inhibicija endocitoze korištenjem kemijskih inhibitora onemogućuje funkciju proteina uključenih u endocitozu. Probir kemijskih inhibitora u A549 i A549-E6 stanicama pokazao je snažno povećanje uspješnosti transdukcije s HAdV26 nakon izlaganja stanica inhibitoru pitstop 2 te smanjenje uspješnosti transdukcije s HAdV26 nakon izlaganja stanica inhibitoru dyngo 4a. Izlaganja stanica inhibitoru pitstop 2 povećava uspješnost transdukcije s HAdV26 u A549 stanicama oko 9 puta, a u A549-E6 stanicama oko 5 puta (Slika 37). Kako je pitstop 2 inhibitor klatrinom posredovane endocitoze, rezultati potvrđuju ulogu klatrinom posredovane endocitoze na uspješnost transdukcije s HAdV26.

Izlaganje stanica inhibitoru dyngo 4a smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV26 u A549 i A549-E6 stanicama 1.7 puta. Rezultati potvrđuju da inhibicija dinaminom posredovane endocitoze smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV26.

Dodatno, u A549-E6 stanicama statistički značajno je povećana uspješnost transdukcije s HAdV26 nakon izlaganja stanica inhibitoru dynasore (1.2 puta) i cytochalasin D (2.3 puta).

Tablica 19. Popis korištenih kemijskih inhibitora endocitoze i opisano njihovo djelovanje.

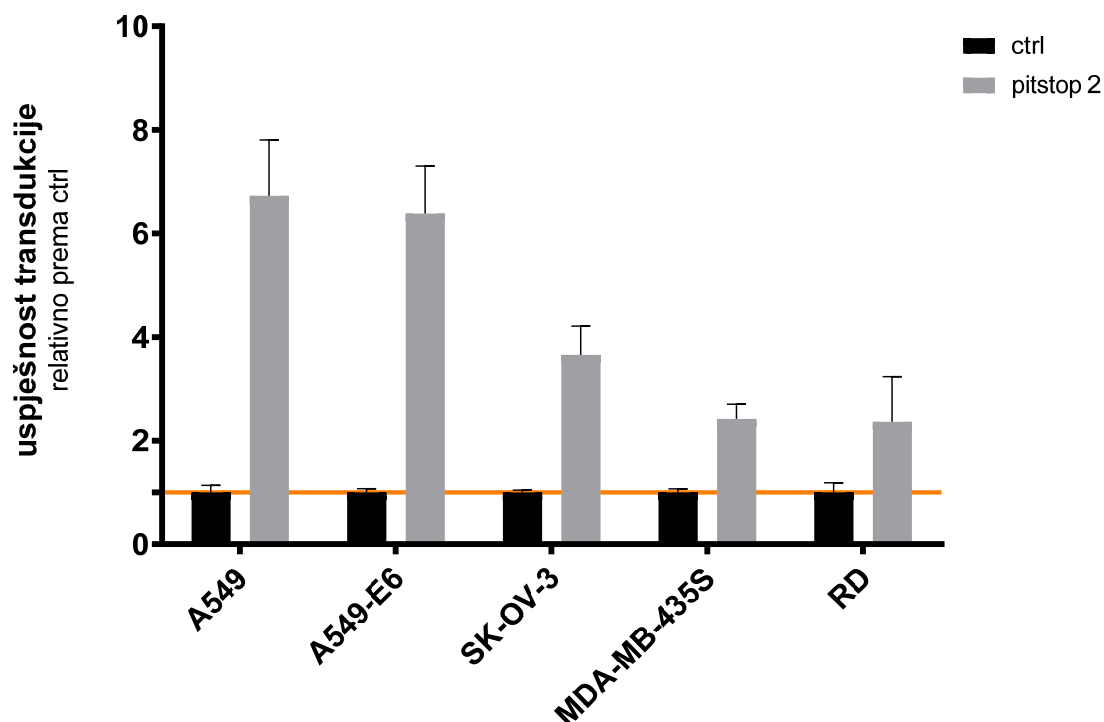
| Kemijski inhibitor | Meta | Djelovanje | Referenca |
|-----------------------|---|--|---|
| pitstop 2 | klatrinom posredovana endocitoza | inhibira vezanje klatrina na endocitozni mjehurić | von Kleist i sur (2011) |
| filipin III | kaveolinom posredovana endocitoza | odvajanjem kolesterola inhibira nastajanje lipidnih splavi i kaveolinom posredovanu endocitozu | Orlandi i Fishman (1998) Ros-Baro i sur. (2001) Smart i Anderson (2002) |
| dyngo 4a | dinamin | inhibira djelovanje GTPaza dinamin-1, dinamin-2 | McCluskey i sur. (2013) |
| dynasore | dinamin, klatrinom posredovana endocitoza | inhibira djelovanje GTPaza dinamin-1, dinamin-2, Drp1, inhibira formiranje klatrinom obloženog mjehurića | Macia i sur. (2006) |
| cytochalasin D | fagocitoza, makropinocitoza | depolimerizira F-aktin | Mager i sur. (2012) Sampath i sur. (2012) Fujimoto i sur (2000) |



Slika 37. Uspješnost transdukcije A549 i A549-E6 stanica s HAdV26 nakon izlaganja kemijskim inhibitorima endocitoze. Stanice su inkubirane u mediju (ctrl) ili kemijskom inhibitoru endocitoze, nakon čega je dodan HAdV26 (MOI 10^4), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema si(-) \pm SD. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

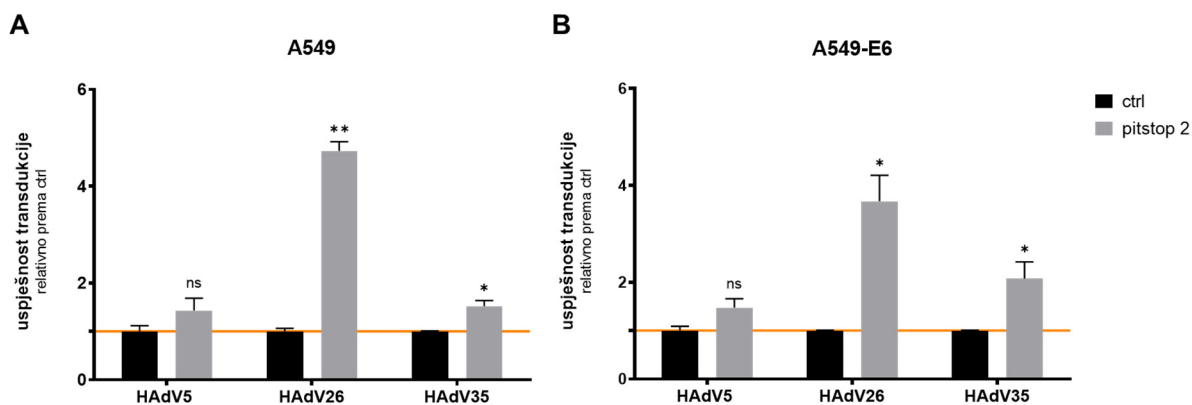
Kako bismo isključili vjerojatnost da izlaganje stanica inhibitoru pitstop 2 povećava uspješnost transdukcije s HAdV26 specifično u A549 staničnoj liniji te pripadajućem klonu A549-E6, određena je uspješnost transdukcije s HAdV26 nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2 i u sljedećim staničnim linijama: SK-OV-3, MDA-MB-435S i RD (Slika 38). Rezultati pokazuju da izlaganje stanica inhibitoru pitstop 2 povećava uspješnost transdukcije s HAdV26 u svim ispitanim staničnim linijama, od 2 do 6.5 puta, što ukazuje da učinak nije specifičan za A549 staničnu liniju, iako je kod nje utjecaj pitstopa 2 na uspješnost transdukcije s HAdV26 najveći.

HAdV26



Slika 38. Uspješnost transdukcije A549, A549-E6, SK-OV-3, MDA-MB-435S i RD stanica s HAdV26 nakon izlaganja stanica inhibitoru pitstop 2. Stanice su inkubirane u mediju (ctrl) ili pitstopu 2, nakon čega je dodan HAdV26 (MOI 10^4), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema si(-) \pm SD.

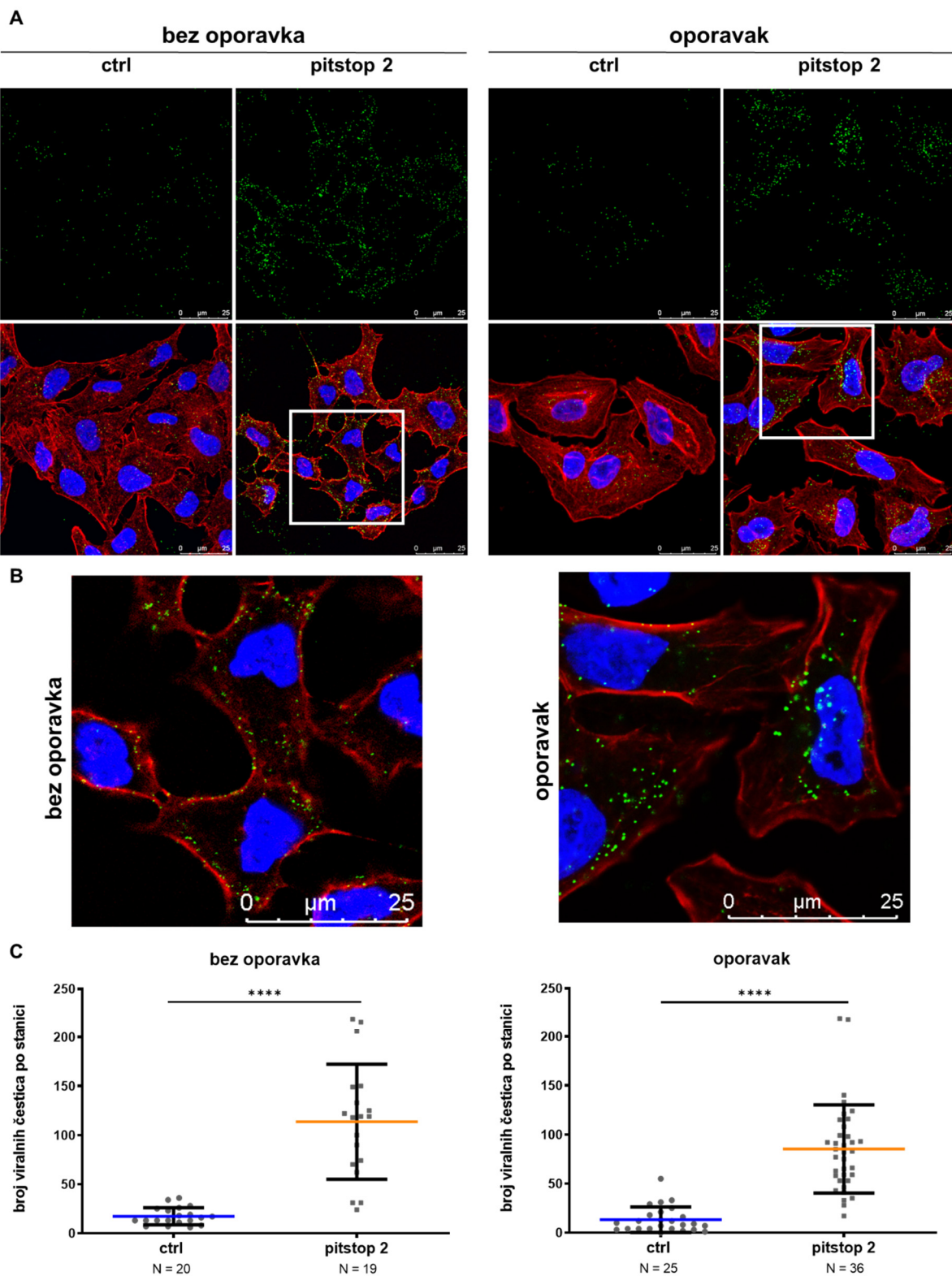
Kako je među kemijskim inhibitorima endocitoze pitstop 2 najviše promijenio uspješnost transdukcije s HAdV26, dalje je ispitan utjecaj pitstopa 2 na uspješnost transdukcije s druga dva serotipa adenovirusa, HAdV5 i HAdV35 (Slika 39). Pokazano je da pitstop 2 povećava uspješnost transdukcije s HAdV5 1.4 puta u A549 i A549-E6 stanicama, a s HAdV35 1.5 puta u A549 te 2 puta u A549-E6, no značajnije povećanje uspješnosti transdukcije od 5 puta u A549 i 4 puta u A549-E6 stanicama potvrđeno je kod HAdV26.



Slika 39. Uspješnost transdukcije A549 i A549-E6 stanica s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 nakon izlaganja stanica inhibitoru pitstop 2. Stanice su inkubirane u mediju (ctrl) ili pitstopu 2, nakon čega su dodani HAdV5 (MOI 5×10^3), HAdV26 (MOI 10^4) ili HAdV5 (MOI 5×10^3), a uspješnost transdukcije je određena protočnom citometrijom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao MFI relativno prema si(-) \pm SD. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Kako bi se detaljnije istražio utjecaj pitstopa 2 na transdukciju s HAdV26 u A549 staničnoj liniji, određeno je unutarstanično putovanje fluorescentno obilježenih HAdV26 (Slika 40). Korištena su dva uvjeta: bez oporavka i s oporavkom. U uvjetu bez oporavka A549 stanice su nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2 inkubirane s HAdV26 te nakon ispiranja nevezanih virusa odmah fiksirane. U uvjetu bez oporavka primjećeno je da se viralne čestice nalaze bliže rubovima stanice te su stanice pritom promijenile morfologiju točnije skvrčile su se, što se bolje vidi na uvećanom prikazu jednog sloja konfokalnih snimki u kojem je signal jezgre bio najoštrij, tj. u području sredine stanica. HAdV26 čestice se nalaze na samom rubu citoplazmatske membrane ili nešto ispod membrane i nisu uspješno putovale u unutrašnjost stanice, što upućuje da je korištenje pitstopa 2 zaustavilo unutarstanično putovanje HAdV26. Zbog toga su u drugom korištenom uvjetu, s oporavkom, stanice nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2 i inkubacije s HAdV26 isprane i dodatno inkubirane u mediju za uzgoj stanica. Stanice su pokazale morfologiju identičnu onoj prije obrade pitstopom 2, dok se HAdV26 nalazi raspršen po stanici s većinom viralnih čestica u perinuklearnom području, što upućuje da uklanjanje pitstopa 2 omogućuje unutarstanično putovanje HAdV26.

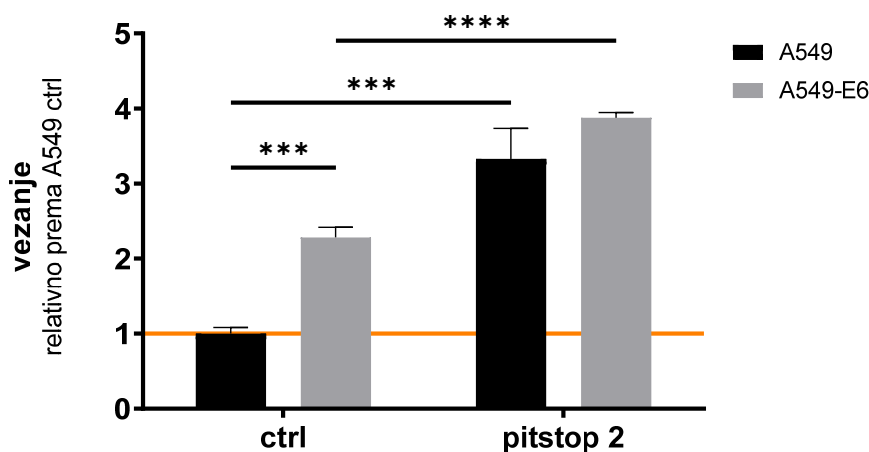
Broj uspješno internaliziranih HAdV26 je u A549 staničnoj liniji povećan nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2, u uvjetu bez oporavka 6.6 puta te 6.4 puta u uvjetu s oporavkom što je u skladu s rezultatima mjerenja uspješnosti transdukcije.



Slika 40. Unutarstanično putovanje HAdV26 u A549 bez oporavka i s oporavkom nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2 (A). Stanice su inkubirane u mediju (ctrl) ili pitstopu 2 kroz 30 min pri 37°C, nakon čega je dodan HAdV26-AF488 (MOI 2 x 10⁴) i inkubiran 1 h pri 37°C. Nakon ispiranja nevezanih virusa, stanice su u uvjetu bez oporavka fiksirane, dok su u uvjetu s oporavkom fiksirane nakon dodatne inkubacije 1 h pri 37°C u mediju. Zeleno – HAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra (DAPI). Prikazana su reprezentativna vidna polja kao maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. **Uvećani prikaz smještaja HAdV26 unutar stanica (B).** Bijeli okvir pod (A) označava

područje koje je uvećano pod (B). Prikazane su konfokalne snimke jednog sloja s najoštrijim signalom jezgre. **Kvantifikacija uspješnosti internalizacije virusa (C)** prikazana kao broj viralnih čestica po stanici. Simbol prikazuje broj viralnih čestica u određenoj stanici, linije prikazuju srednju vrijednost \pm SD. N označava broj analiziranih stanica. (**** $P < 0,0001$).

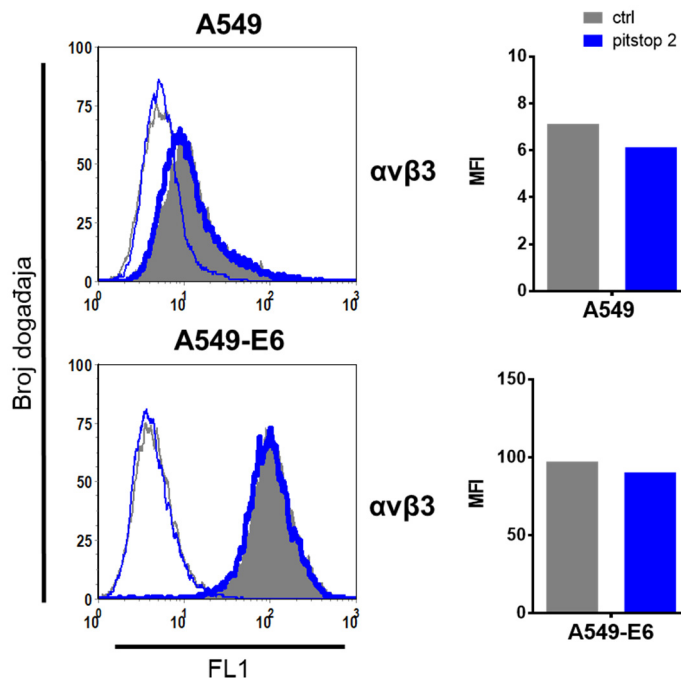
S obzirom da pitstop 2 povećava uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u stanice, ispitano je da li je to posljedica povećanog vezanja na stanice (Slika 41). HAdV26 je pokazao 3 puta veće vezanje nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2 u A549 stanicama te 1.7 puta u A549-E6 stanicama. Pritom su A549-E6 stanice u odnosu na A549 pokazale bolje vezanje s HAdV26 što je u skladu s prijašnjim rezultatima (Slika 13A). Iz ovih rezultata može se zaključiti da pitstop 2 povećava vezanje HAdV26 na površinu stanica i to značajnije u stanicama s manjom ekspresijom receptora $\alpha\beta 3$ integrina (A549) u odnosu na stanice s većom ekspresijom receptora $\alpha\beta 3$ integrina (A549-E6).



Slika 41. Vezanje HAdV26 na A549 i A549-E6 nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2. Stanice su inkubirane u mediju (ctrl) ili pitstopu 2, nakon čega je dodan HAdV26 ($MOI 10^3$) te je nakon vezanja virusa iz taloga stanica izolirana ukupna DNA (stanična i viralna) korištena za kvantifikaciju viralne DNA metodom Real Time PCR s početnicama specifičnim za CMV regiju virusa. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrijednosti relativno u odnosu na A549 stanice ctrl \pm SD. (** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

Kako bismo ispitali utječe li pitstop 2 na dostupnost receptora $\alpha\beta 3$ integrina na površini stanica, određena je površinska ekspresija $\alpha\beta 3$ integrina nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2 u A549 i A549-E6 staničnim linijama (Slika 42). Rezultati pokazuju da obrada stanice pitstopom 2 ne mijenja količinu $\alpha\beta 3$ integrina na površini stanica, što upućuje na zaključak da povećanje vezanja HAdV26 nakon izlaganja stanica

inhibitoru pitstop 2 nije posljedica povećane količine dostupnog receptora $\alpha\beta 3$ integrina.



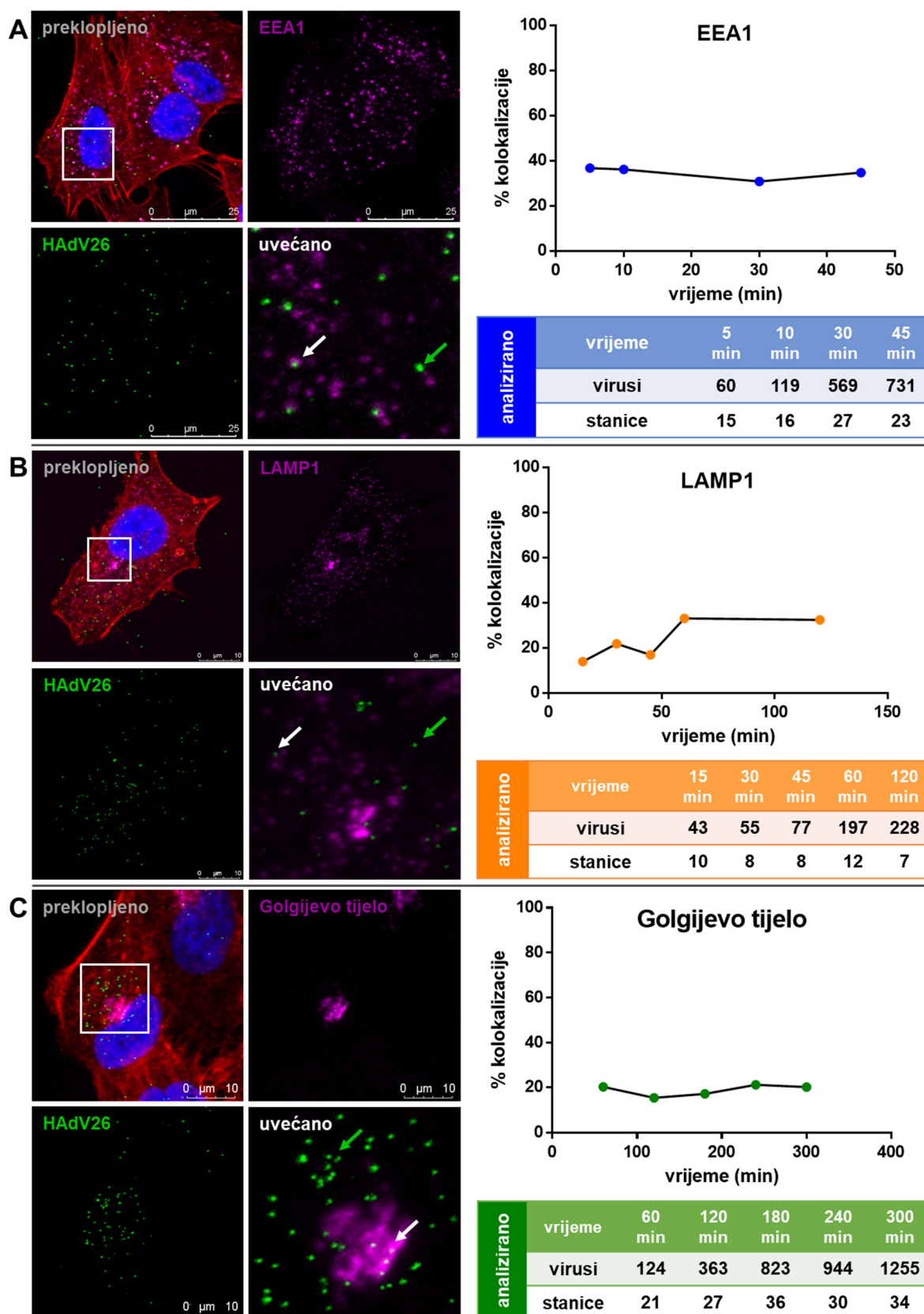
Slika 42. Površinska ekspresija $\alpha\beta 3$ integrina na staničnim linijama A549 i A549-E6 nakon izlaganja inhibitoru pitstop 2. Stanice su inkubirane u mediju (ctrl) ili pitstopu 2, nakon čega su uzorci analizirani protočnom citometrijom. Histogrami tankih linija predstavljaju izotipske kontrole za ctrl uzorak (sivom bojom) ili pitstop 2 uzorak (plavom bojom), sivo ispunjeni histogrami predstavljaju ekspresiju $\alpha\beta 3$ u ctrl uzorku, a histogrami označeni debljom plavom linijom predstavljaju ekspresiju $\alpha\beta 3$ u pitstop 2 uzorku. Desno prikazani grafovi su kvantificirani histogrami kao MFI vrijednosti.

4.7. Tijekom unutarstaničnog putovanja HAdV26 u A549 stanicama udio viralnih čestica koje kolokaliziraju s LAMP1 raste s povećanjem vremena inkubacije

Adenovirusi za unutarstanično putovanje koriste sustav endosoma. Kako bismo istražili u kojem tipu endosoma se tijekom unutarstaničnog putovanja HAdV26 nalazi, odnosno da bismo utvrdili dolazi li do njegovog zaostajanja u nekom od endosoma, konfokalnim mikroskopom je istražena kolokalizacija fluorescentno obilježenog HAdV26 s biljezima koji definiraju identitet pojedine komponente sustava endosoma (Tablica 4). U razdoblju od 5 min do 45 min nakon inkubacije A549 stanica s HAdV26, udio viralnih čestica koje kolokaliziraju s EEA1 se značajno ne mijenja s povećanjem vremena inkubacije, već iznosi od 31% do 37%. Za razliku od EEA1, kolokalizacija HAdV26 s LAMP1 se povećava s povećanjem vremena inkubacije. Udio viralnih

čestica koje kolokaliziraju s LAMP1 povećan je u razdoblju od 15 min nakon transdukcije s 13% do 33% u razdoblju 60 min nakon transdukcije. U razdoblju od 60 min do 120 min, udio viralnih čestica koje kolokaliziraju s LAMP1 ne mijenja se značajno i zadržava udio kolokalizacije iznad 30% (Slika 43).

Kako su rezultati transdukcije i nakon dugotrajne inkubacije HAdV26 na A549 stanicama pokazali da nema jakog nakupljanja HAdV26 u području jezgre, već se većina viralnih čestica nalazi grupirano na jednoj strani u širem perinuklearnom području (Slika 20), ispitana je kolokalizacija HAdV26 s Golgijevim tijelom u razdoblju od 60 min do 300 min nakon dodavanja virusa. Rezultati pokazuju da se udio viralnih čestica koje kolokaliziraju s Golgijevim tijelom tijekom vremena ne mijenja značajno i iznosi oko 20%.



Slika 43. Unutarstanično putovanje HAAdV26 i kolokalizacija s EEA1, LAMP1 i Golgijevim tijelom. Stanice su transducirane s HAAdV26-AF488 (MOI 2×10^4) i inkubirane na ledu 30 min, nakon čega su inkubirane navedeno razdoblje pri 37°C. Korištenjem specifičnih protutijela fluorescentno su obilježeni EEA1, LAMP1 ili Gogijevo tijelo. Zeleno – HAAdV26-AF488, crveno – aktin (faloidin), plavo – jezgra

(DAPI), magenta – EEA1/LAMP1/Golgijevo tijelo. Bijeli okvir označava područje koje je uvećano. Prikazane su reprezentativne maksimalne projekcije konfokalnih snimaka po slojevima. Bijele strelice označavaju kolokalizaciju, dok zelene strelice prikazuju odsutnost kolokalizacije. Na grafovima desno prikazana je kvantifikacija kolokalizacije kao % kolokalizacije, tj. udio viralnih čestica koje kolokaliziraju, određena po slojevima konfokalnih snimaka. U tablicama je prikazan broj virusa kojima je određena kolokalizacija iz navedenog broja stanica u određenom vremenskom razdoblju.

4.8. Ulazak HAdV26 u A549 i SK-OV-3 stanične linije potiče ekspresiju gena uključenih u urođeni imunosni odgovor, pri čemu je ta ekspresija jača od one potaknute ulaskom HAdV5, ali slabija od HAdV35

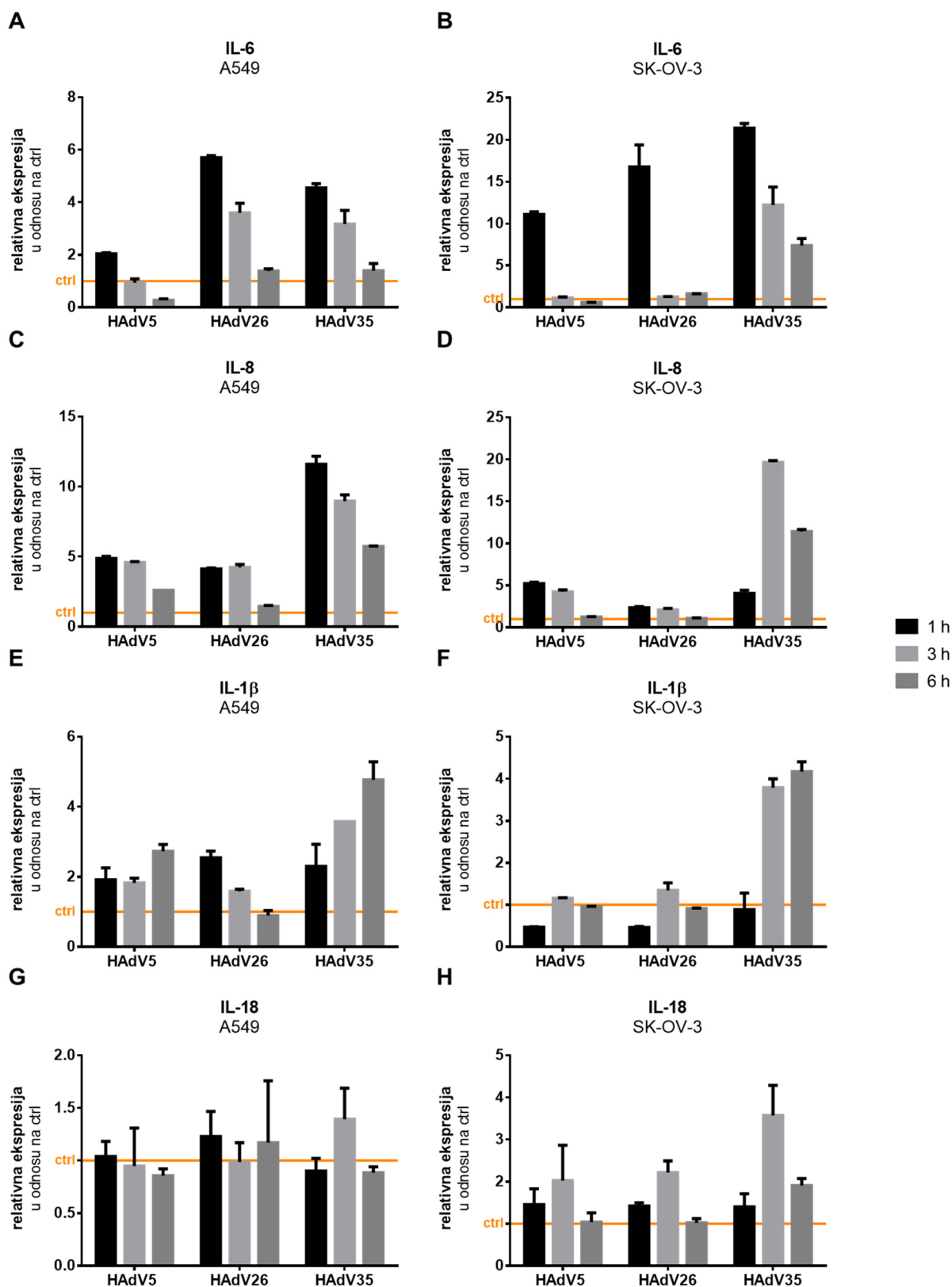
Kako bismo istražili urođeni imunosni odgovor stanica epitela na infekciju s adenovirusima, određena je ekspresija najčešćih citokina i kemokina za koje se zna da su potaknuti infekcijom s HAdV: interleukina 6 (IL-6), interleukina 8 (IL-8), interleukina 1 beta (IL-1 β) te interleukina 18 (IL-18). A549 i SK-OV-3 stanične linije inficirane su s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 i stanični talozi su skupljeni 1 h, 3 h i 6 h nakon infekcije te im je određena ekspresija gena IL-6, IL-8, IL-1 β te IL-18 u odnosu na ekspresiju gena u kontrolnim neinficiranim stanicama (Slika 44).

IL-6 je povećano eksprimiran nakon infekcije sa sva tri ispitana serotipa adenovirusa, najviše 1 h nakon infekcije u A549 kod HAdV26 oko 6 puta te kod HAdV35 oko 5 puta te u SK-OV-3 kod HAdV26 oko 15 puta te kod HAdV35 oko 20 puta. HAdV5 također povećava ekspresiju IL-6 1 h nakon infekcije, ali slabije nego HAdV26 ili HAdV35, 2 puta u A549, a oko 10 puta u SK-OV-3 stanicama. Zanimljivo, s vremenom pada ekspresija IL-6, pritom zadržavajući povećanu ekspresiju u odnosu na neinficirane stanice. Samo u slučaju HAdV5 ekspresija IL-6 je niža od ekspresije IL-6 u neinficiranim stanicama 6 h nakon infekcije. HAdV35 najduže zadržava povećanu ekspresiju IL-6.

IL-8 je oko 5 puta pojačano eksprimiran nakon infekcije s HAdV5 u obje stanične linije, dok je HAdV26 oko 5 puta pojačano eksprimiran u A549, a samo oko 2 puta u SK-OV-3 staničnoj liniji. Za razliku od njih, HAdV35 snažno povećava ekspresiju IL-8, oko 12 puta u A549 1 h nakon infekcije i oko 20 puta u SK-OV-3 staničnoj liniji 3 h nakon infekcije. S vremenom, ekspresija IL-8 pada sa sva tri virusa, uz iznimku HAdV35 u SK-OV-3 staničnoj liniji gdje je spomenuto povećanje ekspresije IL-8 od oko 20 puta detektirano 3 h nakon infekcije, a 1 h nakon infekcije ekspresija IL-8 bila je povećana oko 5 puta.

Ekspresija IL-1 β je nakon infekcije s HAdV5 u A549 stanicama povećana u sva tri vremena oko 2 puta, dok u SK-OV-3 stanicama pada 2 puta 1 h nakon infekcije, a nakon toga je na razini ekspresije u neinficiranim stanicama. Obrazac ekspresije IL-1 β nakon infekcije s HAdV26 u A549 stanicama suprotan je obrascu u SK-OV-3 stanicama. Tako je ekspresija IL-1 β nakon infekcije s HAdV26 u A549 stanicama 2 puta viša 1 h nakon infekcije, pa se smanjuje i gotovo je jednaka ekspresiji u neinficiranim stanicama 3 h i 6 h nakon infekcije, dok je u SK-OV-3 stanicama 1 h nakon infekcije 2 puta niža, a potom raste i gotovo je jednaka ekspresiji u neinficiranim stanicama 3 h i 6 h nakon infekcije. Samo HAdV35 snažno povećava ekspresiju IL-1 β , od 2 do 5 puta u A549 stanicama te oko 4 puta u SK-OV-3 stanicama.

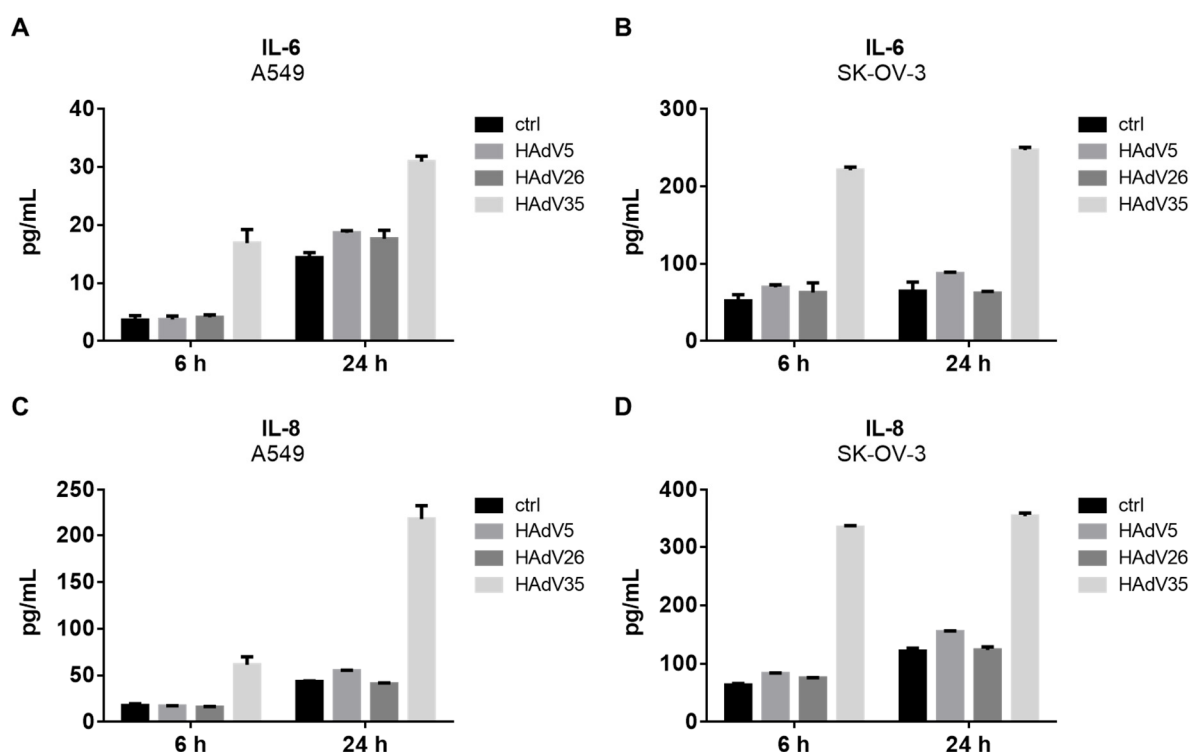
Ekspresija IL-18 gotovo je jednaka ekspresiji u neinficiranim stanicama nakon infekcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35, jedino je 3 h nakon infekcije s HAdV35 povećana oko 3 puta.



Slika 44. Ekspresija citokina i kemokina u A549 i SK-OV-3 staničnoj liniji nakon infekcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35. Stanice su inkubirane s HAdV5, HAdV26 ili HAdV35 (MOI 10^4) kroz 1 h, 3 h ili 6 h. Ekspresija pojedinog citokina i kemokina je određena metodom Real Time PCR korištenjem specifičnih početnica. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednosti relativno u odnosu na neinficirane (ctrl) stanice \pm SD.

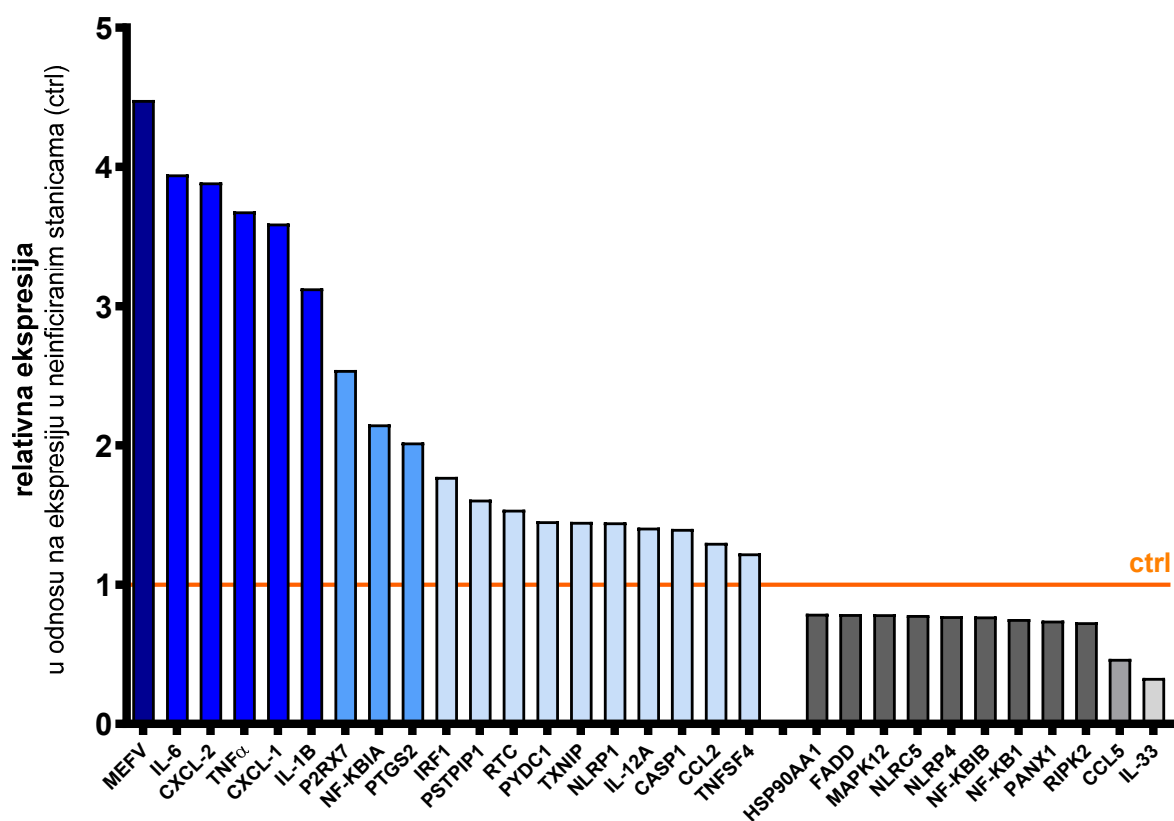
Osim određivanjem ekspresije gena uključenih u urođeni imunski odgovor stanica, ELISA metodom je određena i količina izlučenih IL-6, IL-8 i IL-1 β nakon infekcije s HAdV (Slika 45). IL-6 se u odnosu na neinficirane stanice pojačano izlučuje u medij samo nakon infekcije s HAdV35, oko 3 puta 6 h nakon infekcije te oko 2 puta 24 h nakon infekcije u A549 te oko 4 puta u SK-OV-3 staničnoj liniji. Pritom je primjećeno da se i u neinficiranim stanicama količina IL-6 povećava 2.5 puta s povećanjem vremena inkubacije od 6 h do 24 h. Količina IL-8 se također značajno više izlučuje u medij samo nakon infekcije s HAdV35, oko 3.5 puta nakon 6 h i 4.8 puta nakon 24 h u A549 te oko 5 puta nakon 6 h i 3 puta nakon 24 h u SK-OV-3 staničnoj liniji.

A549 i SK-OV-3 stanična linija nisu pokazale izlučivanje IL-1 β u neinficiranim stanicama niti nakon infekcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 (rezultati nisu prikazani).



Slika 45. Izlučivanje citokina i kemokina iz A549 i SK-OV-3 staničnih linija nakon infekcije s HAdV5, HAdV26 i HAdV35. Stanice su inkubirane s HAdV5, HAdV26 ili HAdV35 (MOI 10⁴) kroz 6 h ili 24 h. Supernatant iznad stanica je korišten za analizu količine citokina i kemokina ELISA metodom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima kao količina izlučenih citokina i kemokina izražena u pg/mL \pm SD.

Korištenjem *RT2 PCR Profiler Array* analizirana je ekspresija gena uključenih u inflammasom nakon infekcije A549 stanica s HAdV26 u odnosu na ekspresiju u A549 stanicama koje nisu inficirane virusom. Gen GAPDH je korišten za normalizaciju rezultata. Na Slici 46 prikazani su geni čija ekspresija je nakon infekcije s HAdV26 promijenjena >1.2 ili <0.8 puta. Geni čija ekspresija je najviše povećana nakon infekcije s HAdV26 su: 4.5 puta MEFV (engl. *mediterranean fever*), 3.9 puta IL-6 (interleukin 6), 3.9 puta CXCL-2 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 2*), 3.7 puta TNF α (engl. *tumor necrosis factor alpha*), 3.6 puta CXCL-1 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) te 3.1 puta IL-1 β (interleukin 1 β). U Tablici 20 prikazani su geni čija ekspresija nije promijenjena >1.2 ili <0.8 puta nakon infekcije s HAdV26 u odnosu na neinficirane stanice.



Slika 46. Ekspresija molekula uključenih u inflammasom u A549 staničnoj liniji nakon infekcije s HAdV26. Stanice su inkubirane s HAdV26 (MOI 10^4). Ekspresija pojedine molekule uključene u inflammasom određena je korištenjem *RT2 PCR Profiler Array* metodom Real Time PCR. Prikazan je rezultat jednog pokusa kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednosti relativno u odnosu na neinficirane (ctrl) A549 stanice. Značenje kratica navedeno je u prilogu 1.

Tablica 20. Popis gena čija ekspresija nije promijenjena nakon infekcije A549 stanica s HAdV26.
Značenje kratica navedeno je u prilogu 1.

| Geni čija ekspresija u A549 stanicama nakon infekcije s HAdV26 nije promijenjena >1.2 ili <0.8 puta | | | | | |
|--|----------|--------|-------|--------|---------|
| BCL-2 | CHUK | IRAK1 | MAPK9 | NOD1 | TIRAP |
| BCL2L1 | CTSB | IRF-2 | MYD88 | PEA15 | TNFSF14 |
| BIRC2 | HSP90AB1 | MAP3K7 | NAIP | PYCARD | TRAF6 |
| BIRC3 | HSP90B1 | MAPK1 | NLRC4 | MOK | XIAP |
| CARD6 | IK-BKB | MAPK11 | NLRP3 | RELA | ACTB |
| CASP8 | IK-BKG | MAPK13 | NLRP6 | SUGT1 | B2M |
| CCL7 | IL-12B | MAPK3 | NLRP9 | TAB1 | HPRT1 |
| CFLAR | IL-18 | MAPK8 | NLRX1 | TAB2 | RPLP0 |

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

S obzirom da se genom adenovirusa ne ugrađuje u genom stanica domaćina i shodno tome ne nasljeđuje u sve stanice kćeri, odnosno da adenovirusi prilikom infekcije potiču pogodan odgovor urođene i stečene imunosti stanica, adenoviralni vektori su pogodni za prolaznu ekspresiju transgena kakva odgovara genskoj terapiji tumora i vektorskim vakcinama. Upravo su zbog toga vektori temeljeni na adenovirusima najčešće korišteni vektori u kliničkim istraživanjima genske terapije tumora te kao vektorske vakcine za ekspresiju specifičnih antigena.

Većina adenoviralnih vektora je temeljena na HAdV5 i pritom su to ili replikacijski defektni (upotreba za gensku terapiju i kao vektorske vakcine) ili uvjetno replikacijski vektori, osobito onkolitički adenoviralni vektori (upotreba za gensku terapiju tumora). Prva dva lijeka odobrena za gensku terapiju tumora, *Gendicine* i *Oncorine*, temelje se upravo na adenoviralnim vektorima. Navedena dva lijeka odobrena su u Kini za liječenje tumora glave i vrata. *Gendicine* je odobren 2003., a temeljen je na HAdV5 i kodira za tumor supresor p53. U kombinaciji s kemoterapijom, radioterapijom i drugim konvencionalnim načinima liječenja *Gendicine* je pokazao značajno bolje rezultate liječenja u odnosu na konvencionalne načine liječenja (Xia i sur., 2020). *Oncorine* je onkolitički vektor temeljen na HAdV5 s delecijom u E1B području genoma, odobren za korištenje u Kini 2005. i do danas ga nijedna druga zemlja nije odobrila (Guo i Song, 2018).

Trenutno je na tržištu Europske Unije odobrena jedna vektorska vakcina temeljena na HAdV26 protiv virusa Ebole (EMA, 2020), a još je više od 30 kliničkih istraživanja u fazi II/III u kojima se adenoviralni vektori istražuju kao vakcine za infektive bolesti (ClinicalTrials, 2020). Neke od vektorskih vakcina temeljene na adenovirusima koje se nalaze u kliničkim studijama su vakcine protiv HIV-a (temeljene na HAdV5, HAdV26, HAdV35), *Influenza virusa* (temeljene na HAdV4, HAdV5), virusa Ebole (temeljene na HAdV5, HAdV26, HAdV35, adenovirusu čimpanze 3), uzročnika tuberkuloze *Mycobacterium tuberculosis* (temeljene na HAdV5, HAdV35), uzročnika malarije *Plasmodium falciparum* (temeljene na HAdV5, HAdV35, adenovirusu čimpanze 63) (Zhang i Zhou, 2016). U prosincu 2019. u gradu Wuhanu u regiji Hubei u Kini identificiran je novi koronavirus nazvan SARS-CoV-2 (Guan i sur., 2020). Ubrzo nakon toga, u drugim zemljama diljem svijeta zabilježeni su prvi slučajevi zaraze SARS-CoV-

2, a potom se virus silovito proširio diljem svijeta. Bolest koju navedeni virus uzrokuje nazvana je COVID-19 i u većini slučajeva bolest je blaga ili umjerena bez potrebe bolničkog liječenja, ali u manjem broju slučajeva, osobito kod starijih osoba, osoba oboljelih od kroničnih bolesti i imunokompromitiranih osoba može uzrokovati teže posljedice pa i smrt. COVID-19 je proglašena pandemijom, a zbog značajnog utjecaja na živote ljudi diljem svijeta predstavlja globalnu zdravstvenu situaciju koja zahtijeva hitne intervencije (Lai i sur., 2020). Dokaz da su adenovirusi među prvim izborima za razvoj vakcina govori i činjenica da su vakcine temeljene na adenovirusima bile među prvim kandidatima za razvoj vakcina protiv SARS-CoV-2. Od deset potencijalnih vakcina koje su najbrže došle do treće faze kliničkih studija nalaze se četiri vakcine koje su temeljene na replikacijski defektnim adenovirusima (WHO, 2020). Od te četiri potencijalne SARS-CoV-2 vakcine, u jednoj se koristi adenovirus čimpanze, a druge tri su temeljene na HAdV5 i HAdV26.

Ipak, unatoč činjenici da će vakcine temeljene na adenovirusima uskoro biti dostupne na tržištu, još je uvijek mnogo nepoznanica u molekularnim mehanizmima uključenim u interakcije adenovirusa i stanica domaćina tijekom infekcije. Stoga je predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji upravo definiranje puta infekcije s HAdV26, niskoseroprevalentnog serotipa adenovirusa i trenutno vrlo atraktivnog kandidata za razvoj vektorskih vakcina.

Prvi korak u infekciji adenovirusom je vezanje na receptor na površini ciljane stanice (Stasiak i Stehle, 2020). Dosad su CAR, CD46, α v integrini, sijalinska kiselina te SR-A6 opisani kao receptori za uspješnu infekciju stanica s HAdV26 (Abbink i sur., 2007; Chen i sur., 2010; Li i sur., 2012; Stichling i sur., 2018; Baker i sur., 2019). Receptor čistač SR-A6 je identificiran kao receptor za HAdV26 u alveolarnim stanicama sličnim makrofagima miša dobivenim iz jetre miša (Stichling i sur., 2018), a isti receptor dosad nije potvrđen za stanice čovjeka. *In silico* analizom modela minimalne energije korištenjem kristalografskih struktura visoke rezolucije nakon X-zraka pokazano je da bi domena glave vlakna HAdV26 trebala uspostavljati stabilne interakcije sa sijalinskom kiselinom (Baker i sur., 2019), a ti rezultati su potvrđeni smanjenjem količine sijalinske kiseline na površini stanica koja je smanjila i uspješnost transdukcije s kimernim HAdV5 koji ima domenu glave vlakna od HAdV26 (Baker i sur., 2019). Ipak, ovdje treba naglasiti da autori ovog rada nisu koristili čitavu česticu HAdV26, već kimerni HAdV kod kojeg samo glava vlakna potječe od HAdV26, dok ostatak

adenoviralne čestice, uključujući ostale kapsidne proteine važne za ulazak HAdV u stanice (baza pentona, hekson, ostatak proteina vlakna) potječe od HAdV5.

Među stanicama čovjeka, dosad su istraživači opisali receptore za HAdV26 uglavnom koristeći stanice krvi (Abbink i sur., 2007; Li i sur., 2012; Stichling i sur., 2018) dok je samo jedna studija određivanja receptora za HAdV26 napravljena na epitelnim stanicama čovjeka i to staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma Hep3B gdje je pokazano da RGD-4C peptidi djelomično smanjuju uspješnost lize stanica s HAdV17, HAdV24, HAdV26 i HAdV48, što upućuje na uključenost α v integrina u uspješnu infekciju s HAdV podgrupe D, uključujući i HAdV26 (Chen i sur., 2011).

U našim prethodnim rezultatima u grupi dr. sc. Majhen je istražena uloga CAR, CD46 i α v integrina u infekciji epitelnih stanica čovjeka s HAdV26 (Nestić i sur., 2019). Koristeći pristup smanjenja ekspresije proteina CAR, CD46 i α v integrina ili blokiranja njihove dostupnosti korištenjem blokirajućih protutijela pokazano je da smanjenje ekspresije ili blokiranje dostupnosti α v integrina značajno smanjuje uspješnost transdukcije s HAdV26, dok CAR i CD46 nemaju značajan utjecaj na uspješnost transdukcije s HAdV26. To je pokazano i određivanjem uspješnosti transdukcije s HAdV26 u klonovima stanica s povećano eksprimiranim proteinima CAR (CHO-CAR), CD46 (CHO-BC1) i α v integrinima (M21L4). Povećana ekspresija CAR ili CD46 nije utjecala na uspješnost transdukcije s HAdV26, dok je povećana ekspresija α v integrina povećala uspješnost transdukcije s HAdV26. U ovom radu je značajna uloga α v integrina u uspješnost transdukcije s HAdV26 potvrđena smanjenjem transdukcije kod klona 3 α v s nižom ekspresijom α v integrina u odnosu na stanice melanoma MDA-MB-435S (Slika 8). Pokazano je da se uspješnost transdukcije s HAdV26 između različitih epitelnih stanica čovjeka razlikuje, vjerojatno zbog količine receptora eksprimiranih na površini stanica. Tako su uspješnost transdukcije, vezanje i internalizacija HAdV26 značajno više u SK-OV-3 staničnoj liniji nego u A549 staničnoj liniji. Ispitivanje količine receptora HAdV: CAR, CD46 te α v, α v β 3 i α v β 5 integrina pokazalo je da SK-OV-3 stanice imaju manje CAR što potvrđuje prethodna opažanja da CAR nema značajan utjecaj na uspješnu transdukciju s HAdV26. Količine CD46, α v integrina te osobito α v β 3 integrina su više u SK-OV-3 stanicama u odnosu na A549 stanice i potencijalno bi ti receptori mogli posredovati boljem vezanju, internalizaciji i uspješnoj transdukciji s HAdV26.

Prethodnim rezultatima pokazano je da u SK-OV-3 staničnoj liniji s višom ekspresijom α v integrina nakon utišavanja α v integrina dolazi do smanjenja uspješnosti transdukcije s HAdV26 (Nestić i sur., 2019). Da bi se potvrdili prethodno dobiveni rezultati u ovoj disertaciji korišten je obrnuti pristup. Umjesto utišavanja, tj. smanjenja ekspresije proteina od interesa, povećana je ekspresija α v integrina u A549 stanicama s nižom ekspresijom α v integrina i nižom uspješnosti transdukcije s HAdV26 uz pretpostavku da će povećanje ekspresije α v integrina omogućiti i bolju uspješnost transdukcije s HAdV26. Ekspresija α v integrina je povećana stabilnom transfekcijom plazmidom koji kodira za α v integrin. Izdvojena su tri stabilna klonova kod kojih je povećanje ekspresije α v integrina potvrđeno mjerenjem površinske ekspresije α v integrina protočnom citometrijom. Istraživanjem vezanja, internalizacije i uspješnosti transdukcije HAdV26 u A549- α v klonovima u odnosu na A549 staničnu liniju je pokazano da povećanje ekspresije α v podjedinice integrina uzrokuje neznatno povećanje vezanja i internalizacije HAdV26 što je praćeno značajnim povećanjem uspješnosti transdukcije s HAdV26 u skladu s povećanjem površinske ekspresije α v podjedinice integrina.

Kako je poznato da α v podjedinica integrina može stupiti u interakciju s β 1, β 3, β 5, β 6 i β 8 podjedinicom integrina rezultirajući time α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6 i α v β 8 heterodimerima, među kojima su α v β 3 i α v β 5 pokazani kao koreceptori za vezanje HAdV RGD slijedom iz baze pentona, određena je površinska ekspresija tih heterodimera na površini stanica nakon povećanja ekspresije α v podjedinice integrina. U A549- α v klonovima u odnosu na A549 staničnu liniju nije primjećena značajna promjena površinske ekspresije α v β 5 integrina te β 1 podjedinice integrina (a time i α v β 1 heterodimera), ali je zato primjećeno veliko povećanje ekspresije α v β 3 integrina, osobito u klonu A549-E6 koji ima i najveću ekspresiju α v podjedinice integrina, što upućuje da u A549-E6 klonu povećana količina ekspresije α v podjedinice integrina uzrokuje povećanje ekspresije β 3 podjedinice integrina. Na temelju dobivenih rezultata pretpostavljeno je da je među α v integrinima upravo α v β 3 integrin molekula odgovorna za uspješnu transdukciju s HAdV26, dok površinska ekspresija α v β 5 integrina te β 1 podjedinice integrina nema presudnu ulogu u vezanju i uspješnosti transdukcije s HAdV26. Kako bi se dalje potvrdila ova hipoteza, konstruirani su i klonovi A549 stanične linije sa stabilno povećanom ekspresijom β 3 podjedinice integrina, uz pretpostavku da će povećana ekspresija β 3 podjedinice integrina povećati i ekspresiju α v β 3 integrina te omogućiti i bolju uspješnost transdukcije s HAdV26. Iako svi A549-

$\beta 3$ klonovi s povećanom ekspresijom $\beta 3$ podjedinice integrina imaju i povećanu ekspresiju $\alpha\beta 3$ integrina, oni nisu pokazali povećano vezanje ni internalizaciju s HAdV26, što se razlikuje od onoga što je primjećeno za A549-E6 klon. Ipak, uspješnost transdukcije je povećana u sva tri A549- $\beta 3$ klona pri čemu je povećanje uspješnosti transdukcije u skladu s povećanjem površinske ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina. $\beta 3$ podjedinica integrina stupa u interakcije samo s αv i $\alpha 11b$ podjedinicom integrina rezultirajući time heterodimerima $\alpha\beta 3$ i $\alpha 11b\beta 3$. Kako je $\alpha 11b$ podjedinica integrina marker hematopoetskih stanica (Durrant i sur., 2017), pretpostavljeno je da će $\beta 3$ podjedinica integrina u epitelnim A549 stanicama stupiti u interakcije samo s αv podjedinicom integrina rezultirajući $\alpha\beta 3$ integrinom. Stabilno povećana ekspresija $\beta 3$ podjedinice integrina nije uzrokovala promjene u površinskoj ekspresiji $\alpha\beta 5$ integrina te $\beta 1$ podjedinice integrina, što dodatno potvrđuje prethodne rezultate da nemaju presudnu ulogu u vezanju i uspješnosti transdukcije s HAdV26. αv i $\beta 1$ podjedinice integrina se u stanicama eksprimiraju u suvišku jer stupaju u interakcije s mnogim podjedinicama – αv podjedinica integrina s 5 različitih β podjedinica integrina, a $\beta 1$ podjedinica integrina s 12 različitih α podjedinica integrina. Stoga formiranje bilo kojeg heterodimera $\alpha\beta$ integrina ovisi o dostupnosti drugih podjedinica integrina koje nisu αv ili $\beta 1$, pri čemu formiranje αv -heterodimera slijedi hijerarhijski redosljed β podjedinica. Zbog toga je npr. broj molekula heterodimera $\alpha\beta 3$ ili $\alpha\beta 5$ integrina na površini stanice ovisan o količini eksprimiranih $\beta 3$ ili $\beta 5$ podjedinica integrina (Koistinen i Heino, 2002; Ambriović-Ristov i sur., 2004). To može biti objašnjenje zašto je u A549- αv klonovima s povećanom ekspresijom αv podjedinice integrina došlo do povećanja površinske ekspresije samo $\alpha\beta 3$ integrina, a ne i $\alpha\beta 5$ integrina, jer se $\beta 3$ i $\beta 5$ podjedinice integrina natječu za pojačano eksprimiranu αv podjedinicu integrina, što rezultira razlikama u ekspresiji heterodimera $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ integrina. Mehanizam gdje promjena u ekspresiji određene podjedinice integrina ili aktivacija pojedinog heterodimera integrina ometa ekspresiju i/ili aktivaciju drugih podjedinica integrina u pojedinoj stanici naziva se integrin *crosstalk* (Samaržija i sur., 2020).

Kod HEp2 stanične linije s pripadajućim klonovima s povećanom ekspresijom $\alpha\beta 3$ integrina uspješnost transdukcije raste s povećanjem ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina, a kod klona HEp2-K9 upravo kompeticija $\beta 3$ i $\beta 5$ podjedinice za αv podjedinicu integrina smanjuje ekspresiju $\alpha\beta 5$ integrina zbog povećanja ekspresije $\beta 3$ podjedinice, a posljedično i heterodimera $\alpha\beta 3$ integrina. Tako smanjena ekspresija $\alpha\beta 5$ integrina je

za posljedicu imala smanjeno oslobađanje HAdV5 iz endosoma koji time nisu uspješno dopremili genom u jezgru stanica pa je shodno tome i uspješnost transdukcije bila niža (Ambriović i sur., 2004; Majhen i sur., 2009). Za pretpostaviti je da je prilikom transdukcije HEp2-K9 klon s HAdV26 upravo smanjeno oslobađanje HAdV26 iz endosoma razlog što uspješnost transdukcije s HAdV26 u HEp2-K9 klonu nije bila viša u odnosu na HEp2 stanice unatoč povećanoj ekspresiji $\alpha\beta3$ integrina. U staničnoj liniji melanoma MDA-MB-435S primjećen je određeni efekt ravnoteže između $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ integrina, gdje utišavanjem $\beta3$ podjedinice integrina dolazi do smanjenja ekspresije $\alpha\beta3$ integrina, ali se povećava ekspresija $\alpha\beta5$ integrina i obrnuto, utišavanjem $\beta5$ podjedinice integrina dolazi do smanjenja ekspresije $\alpha\beta5$ integrina, ali se povećava ekspresija $\alpha\beta3$ integrina (Stojanović i sur., 2018). Time je ekspresija $\alpha\beta$ integrina na površini stanica stalna.

Primjećen je nesklad između uspješnosti transdukcije i vezanja ili internalizacije HAdV26 u A549 klonovima s povećanom ekspresijom $\alpha\beta3$ integrina, gdje značajno povećana uspješnost transdukcije s HAdV26 određena protočnom citometrijom nije potvrđena kao posljedica značajnijeg povećanja u vezanju ili internalizaciji s HAdV26 određenih *Real Time PCR-om*. Razlog tome mogla bi biti relativno visoka konstanta disocijacije (K_D) između baze pentona HAdV i $\alpha\beta3$ integrina (415 ± 62 nM) kakva je pokazana za HAdV9 (Veesler i sur., 2014). S obzirom da HAdV9 i HAdV26 pripadaju istoj podgrupi HAdV, podgrupi D, pretpostavljeno je da bi K_D za HAdV26 mogla biti slična onoj za HAdV9. Osim toga, protokol određivanja vezanja HAdV na receptore na površini stanica uključuje inkubaciju HAdV na ledu, što ne omogućuje nakupljanje integrina (engl. *integrin clustering*). Naime, $\alpha\beta3$ integrin kao i drugi integrini pokazuje nakupljanje uslijed aktivacije (Cluzel i sur., 2005). Nakon izvanstaničnog ili unutarstaničnog vezanja liganda na integrin i njegove aktivacije dolazi do konformacijskih promjena u integrinu koje uzrokuju prijenos signala putem unutarstaničnih repova integrina i dovode do nakupljanja integrina zajedno s mnoštvom drugih proteina u visokoorganizirani kompleks koji se naziva fokalna adhezija (Samaržija i sur., 2020; Harburger i Calderwood, 2009). Tako formirane fokalne adhezije sadrže veći broj molekula $\alpha\beta3$ integrina koje mogu vezati HAdV. Pri uvjetima na ledu, citoplazmatska membrana je kruća i smanjeno je kretanje proteina, uključujući i integrina, stoga je moguće da su izgubljene informacije o vezanju HAdV26 na $\alpha\beta3$ integrine.

Iako je ukupna struktura i organizacija čestice HAdV26 uglavnom slična onoj HAdV5, postoje neke značajne razlike između ta dva serotipa HAdV. Jedna od razlika je u strukturi baze pentona u kapsidi adenoviralne čestice koja bi mogla imati utjecaj na vezanje αv integrina. Poravnanjem slijeda aminokiselina između HAdV5 i HAdV26 je pokazano da u bazi pentona HAdV26 u odnosu na bazu pentona HAdV5 postoji delecija dvanaest aminokiselinskih ostataka na N-kraju proteina te dvije delecije u petlji koja sadrži RGD slijed kojim se HAdV vežu za αv integrine na površini stanica. Moguće je da navedene delecije čine RGD slijed iz baze pentona HAdV26 manje dostupnim za vezanje na αv integrine na površini stanica. Međutim, HAdV26 ima relativno kratko vlakno sa samo osam ponavljanja β -ploča u odnosu na dvadesetdva ponavljanja β -ploča kod HAdV5. Kratka vlakna smatraju se krutima, što uzrokuje njihovo ograničeno savijanje, dok je kod dugih vlakna adenovirusa podgrupe C savijanje u području koljena nužno za uspostavljanje interakcija između RGD slijeda u bazi pentona i integrina na površini stanica nakon vezanja vlakna s CAR (Wu i sur., 2003; Ambriović-Ristov i sur., 2003). Mjesto vezanja RGD slijeda nalazi se na vrhu podjedinica $\alpha\beta 3$ integrina kada se $\alpha\beta 3$ integrin nalazi u aktiviranoj otvorenoj konformaciji. Prema trenutnom modelu, duljina otvorene konformacije $\alpha\beta 3$ integrina iznosi približno 20 nm (Takagi i sur., 2002). Duljina vlakna HAdV s osam ponavljanja β -ploča iznosi 11 nm (Shayakhmetov i Lieber, 2000). Zbog toga se može pretpostaviti da se HAdV26 može vezati na RGD vezujuće mjesto $\alpha\beta 3$ integrina koji se nalazi u otvorenoj konformaciji pomoću petlje u bazi pentona koja sadrži RGD slijed neovisno o vezanju krutog nesavitljivog vlakna. Slično je već pokazano za HAdV9 iz podgrupe D u usporedbi s HAdV2 iz podgrupe C gdje HAdV9 ima kratko vlakno, a HAdV2 dugo vlakno. Za razliku od HAdV2, vezanje HAdV9 na mnoge stanične linije nije bilo smanjeno uslijed inkubacije s pročišćenim proteinom vlakna koje se s česticom HAdV9 natječe za vezanje na receptor, međutim, vezanje HAdV9 je bilo smanjeno nakon korištenja blokirajućeg protu- αv integrin protutijela. U αv -integrin negativnim stanicama nakon *de novo* ekspresije $\alpha\beta 5$ integrina vezanje HAdV9 nije bilo blokirano korištenjem proteina vlakna, ali jest korištenjem kombinacije proteina vlakna i baze pentona. Ovakvi rezultati pokazuju da je vezanje baze pentona na αv integrine neovisno o vezanju vlakna (Roelvink i sur., 1996). Navedenu hipotezu za HAdV26 je potrebno eksperimentalno dokazati. Dodatno, HAdV se na integrine ne vežu s visokim afinitetom, kao što se vežu na CAR, ali prednost HAdV26 da ukoliko se direktno veže na $\alpha\beta 3$ integrin s bazom pentona to mu odmah uz vezanje omogućuje i ulazak u stanicu potaknuto prijenosom

signala $\alpha\beta3$ integrina i to domenom s RGD slijedom koja je među HAdV visoko konzervirana (nije prisutna samo u dva do sada poznata serotipa HAdV, 40 i 41) što upućuje u njezinu važnost za HAdV.

Uspješnost transdukcije s HAdV uključuje zbroj uspješnosti vezanja, ulaska te unutarstaničnog putovanja HAdV da bi se dopremio genom u jezgru stanice domaćina. U ovom istraživanju su ulazak i unutarstanično putovanje HAdV26 praćeni konfokalnom mikroskopijom u A549 staničnoj liniji i klonovima A549-B4 i A549-E6 koji među izdvojenim klonovima imaju najvišu površinsku ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina i za koje je pretpostavljeno da će pokazati i povećani unos HAdV26 uslijed povećane ekspresije $\alpha\beta3$ integrina. Kapsidni proteini HAdV26 su obilježeni fluorescentnom bojom AF488-5TFP u omjeru u kojem vezanje boje ne utječe na infektivnost adenoviralne čestice (rezultati nisu prikazani). Fluorescentno obilježeni HAdV26 pokazao je povećanje u ulasku u stanice ovisno o povećanju ekspresije $\alpha\beta3$ integrina, dakle, najveći prosječni broj adenoviralnih čestica nakon uspješnog unosa u stanice primjećen je kod A549-E6 klona s najvećom ekspresijom $\alpha\beta3$ integrina, zatim kod A549-B4 klona i najmanji prosječni broj adenoviralnih čestica kod A549 stanične linije koja ima i najmanju ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina na površini stanica.

Dodatno, istražena je i kolokalizacija između HAdV26 i $\alpha\beta3$ integrina eksprimiranog na površini A549-E6 klona. Obilježavanje dviju ili više molekula s različitom fluorescentnom bojom omogućuje da se konfokalnom mikroskopijom ispita postojanje kolokalizacije tj. prostornog preklapanja dviju ili više molekula unutar nekog uzorka. Kolokalizacija upućuje da se molekule nalaze na istom ili vrlo bliskom području te ukazuje na njihovu moguću biološku interakciju. Kolokalizacija je praćena nakon inkubacije fluorescentnog HAdV26 na stanicama na ledu kako bi se omogućilo vezanje HAdV26 na receptore na površini stanica te nakon inkubacije 1 min pri 37°C kako bi se nakon kratkog vremena od vezanja HAdV26 na receptore omogućilo okidanje unosa HAdV26 endocitozom. Time je osigurano da ukoliko postoji slaba veza između receptora i HAdV26 ne dolazi do ispiranja adenoviralne čestice tijekom pripreme uzorka, odnosno da se omogući nakupljanje integrina. Pokazano je da gotovo 80% HAdV26 kolokalizira s $\alpha\beta3$ integrinom u A549-E6 klonu. Rezultati sumarno pokazuju da je $\alpha\beta3$ integrin receptor za HAdV26 u epitelnim stanicama čovjeka.

Već su prva istraživanja adenovirusa pokazala da različiti serotipovi pokazuju različito unutarstanično putovanje. Ovisno o serotipu, adenovirusne kapside su se ili nakupljale

u lizosomima (HAdV47) ili putovale direktno prema ovojnici jezgre (HAdV5) (Chardonnet i Dales, 1970). Većina informacija koju danas znamo o unutarstaničnom putovanju adenovirusa temelji se na istraživanjima podgrupe C (HAdV5) ili podgrupe B (HAdV35). Ove dvije grupe za vezanje na stanicu koriste različite receptore, CAR (HAdV5) odnosno CD46 (HAdV35), što ih usmjerava prema različitim mehanizmima ulaska u stanice. Adenovirusi podgrupe B nakupljaju se u lizosomima dok adenovirusi podgrupe C putuju direktno prema jezgri. Optimalna pH vrijednost za oslobađanje iz endosoma za adenoviruse podgrupe C odgovara onoj ranog endosoma, dok je u slučaju podgrupe B to vrijednost lizosoma. Očito je da je unutarstanično putovanje adenovirusa određeno početnom interakcijom s primarnim receptorom. Naime, promjena vlakna između različitih serotipova također je promijenila i unutarstanično putovanje tako novonastalih kimernih adenovirusa (Miyazawa i sur., 1999; Shayakhmetov i sur., 2003). Sumarno, razlozi zbog kojih se razlikuje unutarstanično putovanje nekog serotipa adenovirusa mogu biti različiti: 1) vezanje na različite receptore na površini stanice okida različite signale za ulazak adenovirusa u stanicu, 2) adenovirusi ulaze u stanice različitim tipom endocitoze, 3) tijekom unutarstaničnog putovanja različiti serotipovi adenovirusa se nalaze u različitim tipovima endosoma iz kojih mogu imati različitu učinkovitost izlaska, 4) putovanje adenovirusa ovisi o motornom proteinu i drugo. U skladu s gore navedenim, a imajući na umu da je u ovom radu pokazano da HAdV26 za uspješnu transdukciju koristi $\alpha\beta3$ integrin, pretpostavljeno je da se unutarstanično putovanje HAdV26 razlikuje od HAdV5 odnosno HAdV35.

Vezanjem na receptor, HAdV ulaze u stanicu receptor-posredovanom endocitozom ili makropinocitozom uslijed čega dolazi do formiranja endosoma u kojem HAdV nastavlja svoje unutarstanično putovanje. Veličina endosoma ovisi o tipu endocitoze pa tako veličina makropinosoma varira između 0.2 i 10 μm dok je uobičajena veličina endosoma kod receptor-posredovanih endocitoza manja od 0.2 μm . Kako je promjer adenoviralne čestice oko 90 nm, za očekivati je da se u pojedinom endosomu kod receptor-posredovanih endocitoza može nalaziti samo jedna ili dvije adenoviralne čestice što bi potencijalno dalo točkast signal virusa u stanici, dok se u makropinosomima može nalaziti više adenoviralnih čestica što bi potencijalno dalo signal virusa u nakupinama i mrljama.

Dosad u literaturi nije opisano kojim tipom endocitoze HAdV26 ulazi u stanice. Analiza usporedbe unutarstaničnog putovanja fluorescentno obilježenih HAdV5, HAdV26 i HAdV35 koja je u ovom radu određena konfokalnom mikroskopijom pokazala je različit obrazac unutarstaničnog putovanja ova tri serotipa HAdV. Jasno je vidljivo da je broj uspješno internaliziranih HAdV26 znatno manji nego kod HAdV5 ili HAdV35, što je u skladu s prethodnim rezultatima grupe Majhen koji pokazuju značajno veću uspješnost transdukcije A549 stanične linije s HAdV5 i HAdV35 u odnosu na HAdV26. Primjećeno je da je signal koji daju fluorescentno obilježeni HAdV5 i HAdV26 točkast dok signal HAdV35 čine nakupine i mrlje jačeg ili slabijeg intenziteta uz poneki točkasti signal. Iz literature je poznato da HAdV5 u stanice ulazi receptor-posredovanom endocitozom (Meier i Greber, 2004; Colin i sur., 2005; Rogee i sur., 2007) dok je pokazano da HAdV35 ulazi makropinocitozom (Kalin i sur., 2010; Amstutz i sur., 2008). S obzirom na izgled signala, može se pretpostaviti da i u A549 staničnu liniju HAdV5 ulazi receptor-posredovanom endocitozom, dok HAdV35 ulazi makropinocitozom. Na osnovi do sad poznate literature i uočenog načina putovanja HAdV5, HAdV26 i HAdV35 pretpostavljeno je da HAdV26 ulazi u stanice receptor-posredovanom endocitozom.

U mehanizme ulaska receptor-posredovanom endocitozom uključen je velik broj molekula među kojima su jedne od najznačajnijih dinamin-2, klatrin i caveolin-1. S obzirom da je za ove molekule iz literature poznato da mogu biti ključne za ulazak HAdV u ciljne stanice u ovom je radu istražena uloga upravo ovih molekula u uspješnosti transdukcije HAdV26.

Smanjenjem ekspresije dinamina-2 korištenjem specifične siRNA ili inhibicijom njegove aktivnosti korištenjem kemijskog inhibitora endocitoze dyngo 4a pokazano je smanjenje uspješnosti transdukcije i/ili uspješnosti internalizacije HAdV26 u A549 i A549-E6 stanice, što upućuje da je ulazak HAdV26 u epitelne stanice čovjeka ovisan o dinaminu-2. Dinamin-2 je ubikvitarno eksprimirana GTPaza i uključen je u više faza sekretornog puta. Dinamin-2 ima ulogu u odvajanju endocitoznog mjehurića od stanične membrane, formiranju vezikula nastalih od Golgijevog tijela, unutarstaničnom putovanju vezikula te regulaciji dinamike mikrotubula i aktinskog citoskeleta (Gonzalez-Jamett i sur., 2013). Dosad je pokazano da dinamin-2 ima ulogu u ulasku mnogih patogena kao što su virus Ebole (Mulherkar i sur., 2011), HIV (Carter i sur., 2011), Hepatitis B (Abdulkarim i sur., 2003), toksin antraksa (Abrami i sur., 2003),

uključujući i adenoviruse, npr. HAdV2 (Wang i sur., 1998). Tipovi endocitoze za koje je pokazano da ovise o aktivnosti dinamina-2 su klatrinom posredovana endocitoza, kaveolinom posredovana endocitoza, IL-2 posredovana endocitoza te fagocitoza (Mercer i sur., 2010). Među njima su u literaturi klatrinom i kaveolinom posredovane endocitoze opisane kao najčešće receptor-posredovane endocitoze koje adenovirusi koriste za ulazak u stanice pa je ulazak HAdV26 dalje istražen nakon promjena u ekspresiji klatrina i kaveolina-1, ključnih proteina u klatrinom ili kaveolinom posredovanoj endocitozi.

Smanjenjem ekspresije klatrina transfekcijom specifičnom siRNA ili konstrukcijom klonova sa stabilno smanjenom ekspresijom klatrina dolazi do povećanja uspješnosti transdukcije i internalizacije HAdV26 u A549 staničnoj liniji, ali ne i u klonu A549-E6 s povećanom ekspresijom $\alpha\beta3$ integrina. Osim povećanja uspješnosti transdukcije HAdV26, utišavanje klatrina povećalo je uspješnost transdukcije i s HAdV5 što je bio neočekivan rezultat s obzirom da je iz literature poznato da HAdV5 za ulazak u stanicu koristi klatrinom-posredovanu endocitozu (Meier i Greber, 2004, Amstutz i sur., 2008). Smanjenje ekspresije kaveolina-1 ne mijenja značajno uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u A549 staničnoj liniji, ali smanjuje uspješnost transdukcije i internalizacije HAdV26 u klonu A549-E6 koji ima povećanu ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina. Ovi rezultati upućuju na važan utjecaj količine eksprimiranog $\alpha\beta3$ integrina na tip ulaska HAdV26 u stanice. Osim toga, moguće je da je promjena ekspresije klatrina i kaveolina utjecala na recikliranje receptora koje adenovirusi koriste za ulazak u stanicu stoga je provjerena ekspresija $\alpha\beta3$ integrina, kao i drugih adenoviralnih receptora u svim uvjetima smanjenja ekspresije klatrina ili kaveolina-1.

Pokazano je da utišavanje klatrina snažno povećava ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina, CAR (primarnog receptora HAdV5) i CD46 (primarnog receptora HAdV35) u A549 stanicama i nešto manje u A549-E6 stanicama, dok utišavanje kaveolina-1 malo povećava ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina i CD46, a jače povećava ekspresiju CAR. Usporedbom profila ekspresije receptora $\alpha\beta3$ integrina, CAR i CD46 s uspješnosti transdukcije i internalizacije HAdV5, HAdV26 i HAdV35 nakon utišavanja klatrina ili kaveolina-1, može se zaključiti da je promjena u uspješnosti transdukcije i internalizacije s adenovirusima nakon utišavanja klatrina posljedica promjena u količini receptora dostupnih za vezanje. Iznimka je u klonu A549-E6, gdje unatoč povećanju ekspresije $\alpha\beta3$ integrina utišavanjem klatrina nema promjene u uspješnosti

transdukcije s HAdV26. Razlog tome mogao bi biti da A549-E6 već ionako imaju dovoljno visoku ekspresiju $\alpha\beta 3$ integrina pa dodatno povećanje količine $\alpha\beta 3$ integrina na površini stanice nema značajan utjecaj na infekciju s HAdV26. Osim toga, pokazano je da utišavanjem ekspresije klatrina dolazi do povećanja ekspresije dinamina-2 u A549-E6 klonu. Potrebno je dodatno istražiti da li povećana ekspresija dinamina-2 u klonu A549-E6 nakon utišavanja klatrina ima ulogu u nepromijenjenoj infekciji s HAdV26.

Važnost klatrina pokazana je i u ulasku i unutarstaničnom putovanju HAdV26 i to korištenjem pitstopa 2, kemijskog inhibitora klatrinom posredovane endocitoze. Naime, inhibicija vezanja klatrina na endosomalni mjehurić zaustavlja HAdV26 s unutrašnje strane stanice blizu citoplazmatske membrane i time onemogućava njegovo unutarstanično putovanje, ali ujedno i povećava broj uspješno vezanih i internaliziranih HAdV26 kao i uspješnost transdukcije s HAdV26 u A549 i A549-E6 staničnim linijama. Povećana infekcija s HAdV26 nije posljedica promijenjene ekspresije $\alpha\beta 3$ integrina na površini stanica. Utjecaj inhibitora pitstop 2 na zaustavljanje internalizacije HAdV26 je reverzibilno, odnosno uklanjanjem pitstopa 2 iz hranjive podloge omogućuje se uspješno unutarstanično putovanje HAdV26 zaustavljenih blizu rubova stanice.

Smanjenjem količine klatrina korištenjem specifične siRNA te inhibicijom klatrinom posredovane endocitoze korištenjem pitstopa 2 pokazano je da klatrin ima dvojaku ulogu u infekciji HAdV26. Utišavanjem klatrina najvjerojatnije dolazi do poremećaja u recikliranju $\alpha\beta 3$ integrina te povećanja količine ovog receptora na površini stanice čime su i uspješnost transdukcije i internalizacije s HAdV26 povećani. U slučaju inhibicije klatrinom posredovane endocitoze nakon djelovanja pitstopa 2 ne dolazi do promjene u ekspresiji $\alpha\beta 3$ integrina, a ipak dolazi do snažnog povećanja uspješnosti transdukcije i vezanja HAdV26. Djelovanje pitstopa 2 zaustavlja HAdV26 ispod membrane blizu ruba stanice, što bi značilo da pitstop 2 ne ograničava vezanje ili ulazak HAdV26, ali onemogućuje unutarstanično putovanje HAdV26. Kako pitstop 2 inhibira vezanje klatrina na već formirani endocitozni mjehurić, hipoteza je da je u formiranom mjehuriću uslijed vezanja HAdV26 došlo do aktivacije i nakupljanja $\alpha\beta 3$ integrina, koji zbog inhibicije kasnijih koraka u formiranju zrelog endocitoznog mjehurića mogu vezati više HAdV26, odnosno inhibicijom klatrinom posredovane endocitoze potencijalni klatrinom obavijeni mjehurić je ostao „otvoren“ i dostupan za nakupljanje većeg broja virusa koji, u trenutku kada se inhibitor ukloni sa stanica,

nastavljaju put prema jezgri. Navedenu hipotezu potrebno je eksperimentalno dokazati. Međutim, može se zaključiti da je za uspješnu transdukciju s HAdV26 važna prisutnost klatrina.

Osim smanjenja uspješnosti transdukcije s HAdV26 u A549-E6 stanicama, koje imaju povećanu ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina, utišavanje kaveolina-1 u A549-E6 i A549-shCAV-1 klonovima kod kojih je ekspresija CAR i CD46 značajno smanjena, a ekspresija $\alpha\beta3$ integrina jako povećana u odnosu na A549 stanice, smanjuje uspješnost transdukcije i s HAdV5 i HAdV35. Smanjenje ekspresije CAR primjećeno kod A549-E6 klona upućuje na međusobnu spregu između ekspresije $\alpha\beta3$ integrina i CAR. Od prije je poznato da povećana ekspresija CAR može smanjiti ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina (Majhen i sur., 2011), a ovaj rad upućuje na to da je moguće i obrnuto, odnosno da povećanje ekspresije $\alpha\beta3$ integrina može smanjiti ekspresiju CAR.

Smanjenje ekspresije klatrina i kaveolina-1 transfekcijom specifičnih siRNA uzrokuje povećanje u ekspresiji receptora $\alpha\beta3$ integrina na površini A549 stanica. Ovo povećanje ekspresije $\alpha\beta3$ integrina uzrokuje povećanje u uspješnosti transdukcije i internalizacije HAdV26 nakon smanjenja ekspresije klatrina, ali ne i nakon smanjenja ekspresije kaveolina-1. Međutim, u klonu A549-E6 s povećanom ekspresijom $\alpha\beta3$ integrina nakon smanjenja ekspresije kaveolina-1 dolazi i do smanjenja uspješnosti transdukcije i internalizacije s HAdV26. Najvažnije, u klonu 69 koji uslijed smanjene ekspresije klatrina ima povećanu ekspresiju $\alpha\beta3$ integrina i povećanu uspješnost transdukcije s HAdV26, nakon utišavanja kaveolina-1 dolazi do smanjenja uspješnosti transdukcije s HAdV26. Dakle, smanjenjem kaveolinom-1 posredovane endocitoze smanjuje se uspješnost transdukcije s HAdV26 kada ovaj virus kao receptor koristi $\alpha\beta3$ integrin, što je dokaz da $\alpha\beta3$ integrin usmjerava HAdV26 na kaveolinom-1-posredovanu endocitozu. Zanimljivo, korištenjem filipina III koji inhibira lipidne splavi i kaveolinom posredovanu endocitozu odvajanjem kolesterola nije došlo do smanjenja uspješnosti transdukcije s HAdV26. Ovi rezultati upućuju na važnost kaveolina-1 u $\alpha\beta3$ integrinom posredovanoj transdukciji HAdV26. Dosad je poznato da ulazak HAdV posredovan integrinima može slijediti više tipova endocitoze, pri čemu je pokazano da integrini mogu ući u stanicu preko lipidnih splavi i smatra se da $\alpha\beta3$ integrin pritom ulazi uz interakcije s kaveolinom-1 (Bridgewater i sur., 2012). Također je pokazano da kada Herpes simplex virus (HSV) u stanice ulazi ovisno o $\alpha\beta3$ integrinu i dinaminu-2 za to koristi lipidne splavi odnosno kaveolinom posredovanu

endocitozu (Gianni i sur., 2010). Važna uloga kaveolina-1 opisana je i za infekciju ehovirusom 1 koji kao primarni receptor koristi $\alpha 2\beta 1$ integrin (Marjomaki i sur., 2002).

Iako se smatra da je klatrinom posredovana endocitoza glavni put ulaska HAdV5 u stanicu, razlog povećanja transdukcije s HAdV5 nakon utišavanja klatrina i uslijed povećanja ekspresije CAR može biti vezanje HAdV5 za D1 domenu CAR pomoću AB petlje glave vlakna s relativno visokim afinitetom (uz konstantu disocijacije $K_D = 1$ nM) (Lortat-Jacob i sur., 2001). Kako je na tim stanicama povećano ekspresiran i $\alpha \beta 3$ integrin koji je koreceptor za HAdV5, moguć je aditivan učinak CAR i $\alpha \beta 3$ integrina na HAdV5 endocitozu. Ovi rezultati razlikuju se od literature. Amstutz i sur. opisuju da je utišavanje klatrina smanjilo transdukciju s HAdV5 i HAdV3 pri čemu autori nisu određivali status receptora nakon utišavanja klatrina tako da ne znamo je li uzrok smanjene uspješnosti transdukcije promjena u receptorima ili promjena same endocitoze (Amstutz i sur., 2008). Osim toga, pokazano je da u nekim slučajevima HAdV5 može koristiti i lipidne splavi i kaveole za ulazak (Meier i sur., 2002), kao i HAdV2, također iz podgrupe C, koji u A549 stanice ulazi kaveolinom posredovanom endocitozom (Yousuf i sur., 2013).

Što se tiče smještaja HAdV tijekom unutarstaničnog putovanja, a nakon ulaska u stanicu, primjećeno je da se HAdV35 uglavnom nalazi grupiran u većem području pokraj jezgre, što odgovara literaturnim podacima da HAdV35, kao i drugi adenovirusi podgrupe B, u stanicu ulazi makropinocitozom nakon čega se nakuplja u lizosomima (Miyazawa i sur., 2001, Teigler i sur., 2014) koji se uobičajeno nalaze u perinuklearnom području. Ipak, potrebno je eksperimentalno dokazati navedenu hipotezu. Većina HAdV5 se nalazi u neposrednoj blizini jezgre dok je HAdV26 raspršen po stanici, što upućuje na različitu dinamiku putovanja između ova dva serotipa virusa. Zbog toga je napravljena usporedba unutarstaničnog putovanja kroz dulje vremensko razdoblje kako bi se utvrdilo je li, i u kojem vremenu, HAdV26 uspješno dolazi do jezgre s ciljem dopremanja genoma. Nevezane adenoviralne čestice su nakon inkubacije na ledu isprane pa je ovakvom postavkom eksperimenta omogućen sinkroniziran početak ulaska, odnosno da adenoviralne čestice HAdV5 i HAdV26 krenu s iste početne točke – vezane na receptore na površini stanice. HAdV5 je pokazao brzo i usmjereno putovanje prema jezgri jer se već nakon 1 h većina virusa nakupila kod jezgre. Nakon 1 h HAdV5 je i dalje uglavnom smješten u blizini jezgre, ali tu je potrebno uzeti u obzir da ukoliko je uspješno došao do jezgre unutar 1 h (Luisoni i Greber, 2016), vjerojatno

se HAdV5 već vezao na NPC na jezgri i unio genom u jezgru stanice domaćina, a signal od HAdV5 koji se i dalje primjećuje konfokalnom mikroskopijom jest signal praznih kapsida i/ili raspadnutih kapsida HAdV5. Za razliku od HAdV5, HAdV26 ni nakon 4 h nije pokazao povećano nakupljanje u području jezgre. Većina čestica HAdV26 se nalazi grupirana na jednoj strani u odnosu na jezgru u širem perinuklearnom području. Dosad je pokazano da se HAdV26 u A549 stanicama nakuplja u kasnim lizosomima što je pokazano kolokalizacijom s LAMP1 (Teigler i sur., 2014). Prijašnji rezultati grupe Majhen (neobjavljeni rezultati) pokazuju da se više od polovice HAdV26 u odnosu na HAdV5 tijekom unutarstaničnog putovanja u trajanju od 45 minuta zadržava u citosolu stanice u nekom od organela s membranom pa je za pretpostaviti da HAdV26 nema tako učinkovit izlazak iz endosoma kao HAdV5.

U ovom radu, ispitana je kolokalizacija HAdV26 s EEA1, LAMP1 i Golgijevim tijelom u A549 stanicama. Pokazano je da se kolokalizacija s EEA1, biljegom ranih endosoma, ne mijenja značajno u razdoblju od 5 min do 45 min nakon infekcije s HAdV26 i iznosi oko 35%. Za razliku od EEA1, kolokalizacija s LAMP1, biljegom kasnih endosoma i lizosoma, se povećava s vremenom nakon infekcije s HAdV26. Nakon 15 min od infekcije, 13% HAdV26 kolokalizira s LAMP1, dok u razdoblju od 60 min do 120 min više od 30% HAdV26 kolokalizira s LAMP1. Ovi rezultati dodatno ukazuju na zaključak da HAdV26 zaostaje u nekom od endosoma.

Teigler i sur. (2014) su pokazali da 45.5% HAdV26 kolokalizira s EEA1 30 min nakon infekcija, a 19.9% 60 min nakon infekcije. Također su pokazali da 25.7% HAdV26 kolokalizira s LAMP1 120 min nakon infekcije. Nakon 120 min oko 10% HAdV26 kolokalizira s EEA1, a oko 20% s LAMP-1. U radu zaključuju da se unutarstanično putovanje HAdV26 značajno razlikuje od HAdV5 i da se HAdV26 nakupljaju u kasnim endosomima. Usporedbom rezultata koji su dobili Teigler i sur. (2014) i rezultata dobivenih u ovom radu, može se vidjeti da je u jednakom vremenskom razdoblju nakon infekcije s HAdV26 dobiven sličan rezultat kolokalizacije HAdV26 s EEA1 (30 min, 45.5% u odnosu na 37%), kao i da se udio HAdV26 koji kolokaliziraju s LAMP1 povećava s povećanjem vremena infekcije. Ipak, Teigler i sur. istraživali su u puno duljem vremenskom razdoblju pa nije moguće usporediti rezultate u više vremenskih točaka. Za bolje razumijevanje unutarstaničnog putovanja HAdV26 potrebno je još detaljnije istražiti kolokalizacije HAdV26 s biljezima endosoma i usporediti ih s putovanjem HAdV5. Nakupljanje u kasnom endosomu slično HAdV26 pokazuje i

HAdV37, također pripadnik podgrupe D, koji u stanice rožnice oka čovjeka ulazi kaveolinom posedovanim putem neovisnim o EEA1, a ovisnim o LAMP1 (Lee i sur., 2020).

Za uspješnu dostavu adenovirusne čestice do jezgre također je važno i vezanje na mikrotubule odnosno putovanje po njima pa tako na različito unutarstanično putovanje HAdV mogu utjecati i motorni proteini koji omogućuju kretanje adenoviralnih čestica po mikrotubulima. Pokazano je da hekson HAdV5 prolazi kroz konformacijske promjene koje mu omogućuju vezanje na dinein preko hipervarijabilne petlje 1 (HVR1) (84). Kako se HVR1 regija razlikuje između HAdV5 i HAdV26, pri čemu je HVR1 regija HAdV26 kraća za 12 aminokiselinskih ostataka (Yu i sur., 2017), moguće je da je vezanje HAdV26 na dinein promijenjeno u odnosu na HAdV5, što bi mogao biti razlog slabijeg putovanja HAdV26 prema jezgri. Osim dineina za kretanje adenovirusa po mikrotubulima važni su i kinezini koji odvođe adenoviruse prema (+) kraju mikrotubula odnosno periferiji stanice (Gazzola i sur., 2009). Moguće je da je vezanje HAdV26 bolje s kinezinima, koji mogu putovati prema oba kraja mikrotubula i tako HAdV26, osim prema jezgri, odvući u smjeru suprotnom od jezgre.

Urođeni imunosni odgovor omogućava neposrednu obranu domaćina te u isto vrijeme potiče stečeni imunosni odgovor (Chaplin, 2010). Adenoviralna kapsida ili DNA predstavljaju PAMP-ove koji u stanici mogu aktivirati urođeni imunosni odgovor, uzrokujući proizvodnju interferona i upalnih citokina (Hartman i sur., 2007; Nociari i sur., 2007). Adenoviralni PAMP-ovi mogu biti prepoznati od strane PRR-ova u svakom koraku puta infekcije virusom: od vezanja i ulaska u stanicu do ulaska DNA u jezgru. Najbolje proučeni PRR-ovi su Toll-slični receptori (TLR). U slučaju HAdV vektora koji kao receptore koriste CAR i CD46 pokazano je da u aktivaciji imunosnog odgovora sudjeluje TLR9 (Iacobelli-Martinez i sur., 2007). Međutim, HAdV vektori mogu aktivirati urođeni imunitet preko MyD88/TLR9-ovisnih i neovisnih mehanizama (Yamaguchi i sur., 2007).

U *in vivo* studijama na eksperimentalnim životinjama evaluira se imunogeničnost pojedinog serotipa adenoviralnih vektora s ciljem probira onih koji će pokazati povoljan imunosni odgovor domaćina i dobru učinkovitost vektora za upotrebu istih u kliničkim studijama s ljudima. Različiti tipovi adenoviralnih vektora mogu biti različito imunogenični u pojedinom organizmu, kao što i isti tip adenoviralnog vektora može imati različiti odgovor u različitim organizmima (Dicks i sur., 2015). Usporedbom šest

nisko seroprevalentnih tipova HAdV (HAdV11, HAdV26, HAdV35, HAdV48, HAdV49, HAdV50) s visoko seroprevalentnim HAdV5 pokazano je da među njima HAdV26 najviše imunogeničan u miševima i rezus majmunima (Abbink i sur., 2007). HAdV26 potiče snažan stanični i humoralni imunski odgovor u ljudi, što ga u kombinaciji s niskom seroprevalentnošću čini izvrsnim kandidatom za razvoj vektorskih vakcina, a to dokazuje i podatak da se već nalazi se u više od 30 kliničkih studija (ClinicalTrials, 2020). Pokazano je da se može opetovano koristiti te da samo jedna doza vakcine protiv HIV dovoljna da izazove povoljan odgovor imunosti (Baden i sur., 2013; Barouch i sur., 2018).

S obzirom da je u ovom radu pokazano da se unutarstanično putovanje HAdV26 značajno razlikuje od onog od HAdV5 odnosno HAdV35 te da postoji vjerojatnost da HAdV26 zaostaje u nekom od endocitoznih odjeljaka, pretpostavka je da će nakon ulaska u stanicu HAdV26 biti prepoznat od različitih senzora imunskog sustava nego što će to biti HAdV5 i/ili HAdV35. U skladu s tim za očekivati je da će ulazak HAdV26 u stanicu potaknuti značajno različit urođeni imunski odgovor od onog potaknutog infekcijom HAdV5 i HAdV35. Stoga je u ovom radu ispitan urođeni imunski odgovor potaknut infekcijom A549 i SK-OV-3 stanica s HAdV5, HAdV26 i HAdV35 te je pokazano da ulazak HAdV26 potiče ekspresiju gena uključenih u urođeni imunski odgovor, pri čemu je ta ekspresija jača od one potaknute ulaskom HAdV5, ali slabija od one potaknute HAdV35.

HAdV26 je pokazao osobito povećanje u ekspresiji IL-6 te IL-8 dok ekspresija IL-1 β i IL-18 nije toliko značajno promijenjena. Međutim, povećana ekspresija IL-6 i IL-8 nakon infekcije s HAdV26 nije dovela do povećanog izlučivanja ovih proteina. Nakon infekcije stanica s HAdV35 osobito je povećana ekspresija te izlučivanje IL-8. Slično je pokazano i za HAdV7 iz podgrupe B adenovirusa koji u tkivu pluća potiče pojačanu ekspresiju i izlučivanje IL-6 i IL-8 i to kao brzi odgovor u razdoblju do 8 h nakon infekcije (Wu i sur., 2010). Važno je primjetiti da je ekspresija IL-6, IL-1 β te IL-18 dobivena ekspresijom gena uključenih u inflammasom vrlo usporediva s vrijednostima dobivene ekspresijom citokina nakon infekcije s HAdV26. Ako se usporedi ekspresija gena IL-6 i IL-8 nakon infekcije s HAdV26 između A549 i SK-OV-3 stanica uočava se da je ekspresija IL-6 u SK-OV-3 stanicama oko tri puta veća u usporedbi s A549 stanicama, dok je ekspresija IL-8 smanjena 2 puta. S obzirom da SK-OV-3 stanice imaju veću količinu $\alpha\beta$ 3 integrina moglo bi se pretpostaviti da je povećana ekspresija IL-6 gena

nakon infekcije HAdV26 posredovana $\alpha\beta 3$ integrinom. U prilog ovome govori rad Browne i sur. (2015) u kojem je pokazano da farmakološka inhibicija $\beta 3$ integrina dovodi do smanjenja IL-6 nakon infekcije onkolitičkim adenovirusom (Browne i sur., 2015). U *in vivo* studiji u miševima je pokazano da vezanje HAdV5 na $\beta 3$ integrin potiče ekspresiju IL-1 α , ali ne i IL-1 β , dok je povećana ekspresija IL-6, CXCL1, CXCL2 moguća uz aktivan IL-1R1 ovisan prijenos signala (Di Paolo i sur., 2009), dok je u ovom radu pokazana povećana ekspresija IL-6, CXCL1, CXCL2, ali i IL-1 β nakon infekcije s HAdV26. IL-33 ima i proupalna i protuupalna svojstva. Pokazano je da može djelovati i kao citokin i kao transkripcijski faktor koji regulira transkripciju gena uključenih u imunosni odgovor. IL-33 je kao citokin izlučen iz stanica u nekrozi dok je tijekom apoptoze inaktiviran (Miller, 2011). Zanimljivo, nakon infekcije s HAdV26 pokazano je značajno smanjenje ekspresije IL-33 što upućuje na mogući mehanizam kako HAdV26 inhibira apoptozu inficirane stanice.

Ovim radom identificiran je $\alpha\beta 3$ integrin kao receptor za infekciju s HAdV26 te je još jednom istaknuta važnost početne interakcije HAdV s pojedinim receptorom, u ovom slučaju HAdV26 s $\alpha\beta 3$ integrinom, jer upravo interakcije na površini stanica imaju utjecaj na ulazak i unutarstanično putovanje HAdV, a s time je povezano i poticanje urođenog imunosnog odgovora stanica tijekom cijelog puta infekcije virusa. Otkrivanjem molekula uključenih u put infekcije adenovirusima pomoći će razvoju sigurnih i učinkovitih vektora za gensku terapiju tumora i vakcinaciju s ciljem poboljšanja zdravlja ljudi.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Korištenjem staničnih linija A549, SK-OV-3, MDA-MB-435S i HEp2 te njihovih klonova s povećanom ekspresijom αv (A549- αv) ili $\beta 3$ integrina (A549- $\beta 3$), odnosno smanjenom ekspresijom αv integrina (3 αv), pokazano je da povećana količina $\alpha v\beta 3$ integrina povećava uspješnost infekcije s HAdV26. Povećana količina $\alpha v\beta 3$ integrina na površini A549-E6 stanica povećava ulazak HAdV26 pri čemu HAdV26 kolokalizira s $\alpha v\beta 3$ integrinom što pokazuje da je $\alpha v\beta 3$ integrin receptor za HAdV26 u epitelnim stanicama čovjeka.
2. Iako se unutarstanično putovanje HAdV26 značajno razlikuje od HAdV5 i HAdV35, ulazak sva tri promatrana adenovirusa u A549 i A549-E6 stanice ovisan je o dinaminu-2.
3. Smanjenjem ekspresije klatrina u A549 stanicama dolazi do povećanja ekspresije $\alpha v\beta 3$ integrina na površini stanica, što posreduje povećanoj uspješnosti infekcije s HAdV26.
4. Smanjenjem ekspresije kaveolina-1 u A549 stanicama dolazi do povećanja ekspresije $\alpha v\beta 3$ integrina na površini stanica, što nema značajan utjecaj na infekciju s HAdV26. U A549-E6 stanicama s povećanom ekspresijom $\alpha v\beta 3$ integrina te klonu 69 sa stabilno utišanom ekspresijom klatrina i povećanom ekspresijom $\alpha v\beta 3$ integrina utišavanje kaveolina-1 dovodi do smanjenja uspješnosti transdukcije s HAdV26. Sumarno, rezultati upućuju da $\alpha v\beta 3$ integrin usmjerava HAdV26 na kaveolinom-1 posredovanu endocitozu.
5. Inhibicija klatrinom posredovane endocitoze korištenjem inhibitora pitstop 2 u A549 i A549-E6 staničnim linijama zaustavlja HAdV26 s unutrašnje strane blizu ruba stanice i onemogućava njegovo unutarstanično putovanje. Inhibicija klatrinom posredovane endocitoze korištenjem inhibitora pitstop 2 u A549 i A549-E6 staničnim linijama također povećava vezanje i ulazak HAdV26, pritom ne mijenjajući ekspresiju $\alpha v\beta 3$ integrina na površini stanica.

6. Tijekom unutarstaničnog putovanja u A549 staničnoj liniji s povećanjem vremena inkubacije raste i udio HAdV26 koji kolokalizira s LAMP1, biljekom kasnih endosoma i lizosoma, što upućuje na potencijalno mjesto nakupljanja HAdV26.
7. Ulazak HAdV26 u A549 i SK-OV-3 stanične linije potiče ekspresiju gena urođenog imunskog odgovora, poglavito onih uključenih u aktivaciju upalnih procesa kao što su IL-6 i geni inflammasoma. Ekspresija većine promatranih gena veća je od one potaknute ulaskom HAdV5, ali slabija od HAdV35. Suprotno od aktivacije gena, HAdV26 infekcija A549 i SK-OV-3 stanica ne potiče značajno izlučivanje IL-6 i IL-8.
8. Uslijed stabilne transfekcije A549 stanica s plazmidom koji sadrži gen za α v podjedinicu integrina, povećana ekspresija α v integrina u A549- α v klonovima povećava ekspresiju heterodimera α v β 3 integrina, pri čemu ne dolazi do promjene u ekspresiji ostalih heterodimera α v integrina.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- Abbink, P., A. A. Lemckert, B. A. Ewald, D. M. Lynch, M. Denholtz, S. Smits, L. Holterman, I. Damen, R. Vogels, A. R. Thorner, K. L. O'Brien, A. Carville, K. G. Mansfield, J. Goudsmit, M. J. Havenga and D. H. Barouch (2007). "Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D." J Virol **81**(9): 4654-4663.
- Abdulkarim, A. S., H. Cao, B. Huang and M. A. McNiven (2003). "The large GTPase dynamin is required for hepatitis B virus protein secretion from hepatocytes." J Hepatol **38**(1): 76-83.
- Abedia (2020) <<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>>. Pristupljeno 15. listopada 2020.
- Abrami, L., S. Liu, P. Cosson, S. H. Leppla and F. G. van der Goot (2003). "Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process." J Cell Biol **160**(3): 321-328.
- Adams, W. C., E. Bond, M. J. E. Havenga, L. Holterman, J. Goudsmit, G. B. Karlsson Hedestam, R. A. Koup and K. Lore (2009). "Adenovirus serotype 5 infects human dendritic cells via a coxsackievirus-adenovirus receptor-independent receptor pathway mediated by lactoferrin and DC-SIGN." J Gen Virol **90**(Pt 7): 1600-1610.
- Akinc, A. and G. Battaglia (2013). "Exploiting endocytosis for nanomedicines." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(11): a016980.
- Alba, R., A. Bosch and M. Chillon (2005). "Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy." Gene Ther **12 Suppl 1**: S18-27.
- Allen, R. J. and A. P. Byrnes (2019). "Interaction of adenovirus with antibodies, complement, and coagulation factors." FEBS Lett **593**(24): 3449-3460.
- Ambriović Ristov, Brozović, Bruvo Mađarić, Četković, Herak Bosnar, Hranilović, Katušić Hećimović, Meštović Radan, Mihaljević, Slade, Vujaklija, ur. (2007.) Metode u molekularnoj biologiji. 1. izd. Zagreb: Institut Ruđer Bošković.
- Ambriović-Ristov, A., J. Gabrilovac, T. Čimbora-Zovko and M. Osmak (2004). "Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells

- resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin alphavbeta3 and coxsackie adenovirus receptor." Int J Cancer **110**(5): 660-667.
- Ambriovic-Ristov, A., S. Mercier and M. Eloit (2003). "Shortening adenovirus type 5 fiber shaft decreases the efficiency of postbinding steps in CAR-expressing and nonexpressing cells." Virology **312**(2): 425-433.
- Amstutz, B., M. Gastaldelli, S. Kalin, N. Imelli, K. Boucke, E. Wandeler, J. Mercer, S. Hemmi and U. F. Greber (2008). "Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3." EMBO J **27**(7): 956-969.
- Andersson, E. K., Y. F. Mei and G. Wadell (2010). "Adenovirus interactions with CD46 on transgenic mouse erythrocytes." Virology **402**(1): 20-25.
- Anywaine, Z., H. Whitworth, P. Kaleebu, G. Praygod, G. Shukarev, D. Manno, S. Kapiga, H. Grosskurth, S. Kalluvya, V. Bockstal, D. Anumendem, K. Luhn, C. Robinson, M. Douoguih and D. Watson-Jones (2019). "Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccination Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania." J Infect Dis **220**(1): 46-56.
- Appledorn, D. M., S. Patial, A. McBride, S. Godbehere, N. Van Rooijen, N. Parameswaran and A. Amalfitano (2008). "Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo." J Immunol **181**(3): 2134-2144.
- Arnberg, N. (2009). "Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting." Rev Med Virol **19**(3): 165-178.
- Arnberg, N. (2012). "Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors." Trends Pharmacol Sci **33**(8): 442-448.
- Baden, L. R., J. Liu, H. Li, J. A. Johnson, S. R. Walsh, J. A. Kleinjan, B. A. Engelson, L. Peter, P. Abbink, D. A. Milner, Jr., K. L. Golden, K. L. Viani, M. D. Stachler, B. J. Chen, M. G. Pau, M. Weijtens, B. R. Carey, C. A. Miller, E. M. Swann, M. Wolff, H. Loblein, M. S. Seaman, R. Dolin and D. H. Barouch (2015). "Induction of HIV-1-specific mucosal immune responses following intramuscular recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 vaccination of humans." J Infect Dis **211**(4): 518-528.

- Baden, L. R., S. R. Walsh, M. S. Seaman, R. P. Tucker, K. H. Krause, A. Patel, J. A. Johnson, J. Kleinjan, K. E. Yanosick, J. Perry, E. Zablowsky, P. Abbink, L. Peter, M. J. Lampietro, A. Cheung, M. G. Pau, M. Weijtens, J. Goudsmit, E. Swann, M. Wolff, H. Loblein, R. Dolin and D. H. Barouch (2013). "First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001)." J Infect Dis **207**(2): 240-247.
- Bailey, C. J., R. G. Crystal and P. L. Leopold (2003). "Association of adenovirus with the microtubule organizing center." J Virol **77**(24): 13275-13287.
- Baker, A. T., A. Greenshields-Watson, L. Coughlan, J. A. Davies, H. Uusi-Kerttula, D. K. Cole, P. J. Rizkallah and A. L. Parker (2019). "Diversity within the adenovirus fiber knob hypervariable loops influences primary receptor interactions." Nat Commun **10**(1): 741.
- Baker, A. T., C. Aguirre-Hernandez, G. Hallden and A. L. Parker (2018). "Designer Oncolytic Adenovirus: Coming of Age." Cancers (Basel) **10**(6).
- Baker, A. T., R. M. Mundy, J. A. Davies, P. J. Rizkallah and A. L. Parker (2019). "Human adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cell entry receptor." Sci Adv **5**(9): eaax3567.
- Barouch, D. H., F. L. Tomaka, F. Wegmann, D. J. Stieh, G. Alter, M. L. Robb, N. L. Michael, L. Peter, J. P. Nkolola, E. N. Borducchi, A. Chandrashekar, D. Jetton, K. E. Stephenson, W. Li, B. Korber, G. D. Tomaras, D. C. Montefiori, G. Gray, N. Frahm, M. J. McElrath, L. Baden, J. Johnson, J. Hutter, E. Swann, E. Karita, H. Kibuuka, J. Mpendo, N. Garrett, K. Mngadi, K. Chinyenze, F. Priddy, E. Lazarus, F. Laher, S. Nitayapan, P. Pitisuttithum, S. Bart, T. Campbell, R. Feldman, G. Lucksinger, C. Borremans, K. Callewaert, R. Roten, J. Sadoff, L. Scheppler, M. Weijtens, K. Feddes-de Boer, D. van Manen, J. Vreugdenhil, R. Zahn, L. Lavreys, S. Nijs, J. Tolboom, J. Hendriks, Z. Euler, M. G. Pau and H. Schuitemaker (2018). "Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19)." Lancet **392**(10143): 232-243.
- Barry, M. A., J. D. Rubin and S. C. Lu (2020). "Retargeting adenoviruses for therapeutic applications and vaccines." FEBS Lett **594**(12): 1918-1946.

- Bennett, E. M., J. R. Bennink, J. W. Yewdell and F. M. Brodsky (1999). "Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression." J Immunol **162**(9): 5049-5052.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell and R. W. Finberg (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." Science **275**(5304): 1320-1323.
- Blackford, A. N. and R. J. Grand (2009). "Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: multiple roles in viral infection and cell transformation." J Virol **83**(9): 4000-4012.
- Bradley, R. R., D. M. Lynch, M. J. Lampietro, E. N. Borducchi and D. H. Barouch (2012). "Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection." J Virol **86**(1): 625-629.
- Bridgewater, R. E., J. C. Norman and P. T. Caswell (2012). "Integrin trafficking at a glance." J Cell Sci **125**(Pt 16): 3695-3701.
- Browne, A., L. A. Tookman, C. K. Ingemarsdotter, R. D. Bouwman, K. Pirlo, Y. Wang, I. A. McNeish and M. Lockley (2015). "Pharmacological Inhibition of beta3 Integrin Reduces the Inflammatory Toxicities Caused by Oncolytic Adenovirus without Compromising Anticancer Activity." Cancer Res **75**(14): 2811-2821.
- Bru, T., S. Salinas and E. J. Kremer (2010). "An update on canine adenovirus type 2 and its vectors." Viruses **2**(9): 2134-2153.
- Büchen-Osmond, C. (2003). "The universal virus database ICTVdB." Comput Sci Eng **5**(3):16-25.
- Burckhardt, C. J., M. Suomalainen, P. Schoenenberger, K. Boucke, S. Hemmi and U. F. Greber (2011). "Drifting motions of the adenovirus receptor CAR and immobile integrins initiate virus uncoating and membrane lytic protein exposure." Cell Host Microbe **10**(2): 105-117.
- Burmeister, W. P., D. Guilligay, S. Cusack, G. Wadell and N. Arnberg (2004). "Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites." J Virol **78**(14): 7727-7736.

- Campbell, I. D. and M. J. Humphries (2011). "Integrin structure, activation, and interactions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(3).
- Canton, I. and G. Battaglia (2012). "Endocytosis at the nanoscale." Chem Soc Rev **41**(7): 2718-2739.
- Carter, G. C., L. Bernstone, D. Baskaran and W. James (2011). "HIV-1 infects macrophages by exploiting an endocytic route dependent on dynamin, Rac1 and Pak1." Virology **409**(2): 234-250.
- Centers for Disease, C. and Prevention (2007). "Acute respiratory disease associated with adenovirus serotype 14--four states, 2006-2007." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **56**(45): 1181-1184.
- Chandra, N., L. Frangmyr, S. Imhof, R. Caraballo, M. Elofsson and N. Arnberg (2019). "Sialic Acid-Containing Glycans as Cellular Receptors for Ocular Human Adenoviruses: Implications for Tropism and Treatment." Viruses **11**(5).
- Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S3-23.
- Chardonnet, Y. and S. Dales (1970). "Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. II. Comparative observations on the penetration of types 1, 5, 7, and 12." Virology **40**(3): 478-485.
- Charman, M., C. Herrmann and M. D. Weitzman (2019). "Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication." FEBS Lett **593**(24): 3531-3550.
- Chen, C. Y., J. S. Senac, E. A. Weaver, S. M. May, D. F. Jelinek, P. Greipp, T. Witzig and M. A. Barry (2011). "Species D adenoviruses as oncolytics against B-cell cancers." Clin Cancer Res **17**(21): 6712-6722.
- Chen, H., Z. Q. Xiang, Y. Li, R. K. Kurupati, B. Jia, A. Bian, D. M. Zhou, N. Hutnick, S. Yuan, C. Gray, J. Serwanga, B. Auma, P. Kaleebu, X. Zhou, M. R. Betts and H. C. Ertl (2010). "Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae." J Virol **84**(20): 10522-10532.
- Chiu, C. Y., P. Mathias, G. R. Nemerow and P. L. Stewart (1999). "Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin." J Virol **73**(8): 6759-6768.

- Choi, Y. and J. Chang (2013). "Viral vectors for vaccine applications." Clin Exp Vaccine Res **2**(2): 97-105.
- ClinicalTrials (2020) <<https://clinicaltrials.gov>>. Pristupljeno 10. studenog 2020.
- Cluzel, C., F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B. A. Imhof and B. Wehrle-Haller (2005). "The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells." J Cell Biol **171**(2): 383-392.
- Colin, M., L. Mailly, S. Rogee and J. C. D'Halluin (2005). "Efficient species C HAdV infectivity in plasmocytic cell lines using a clathrin-independent lipid raft/caveola endocytic route." Mol Ther **11**(2): 224-236.
- Coughlan, L., R. Alba, A. L. Parker, A. C. Bradshaw, I. A. McNeish, S. A. Nicklin and A. H. Baker (2010). "Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors." Viruses **2**(10): 2290-2355.
- Cox, F., L. van der Fits, P. Abbink, R. A. Larocca, E. van Huizen, E. Saeland, J. Verhagen, R. Peterson, J. Tolboom, B. Kaufmann, H. Schuitemaker, D. H. Barouch and R. Zahn (2018). "Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge." PLoS One **13**(8): e0202820.
- Crawford-Miksza, L. and D. P. Schnurr (1996). "Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues." J Virol **70**(3): 1836-1844.
- Danen (2013.) Integrin signaling as a cancer drug target". *ISRN Cell Biology* 2013:1–14.
- Di Paolo, N. C., E. A. Miao, Y. Iwakura, K. Murali-Krishna, A. Aderem, R. A. Flavell, T. Papayannopoulou and D. M. Shayakhmetov (2009). "Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo." Immunity **31**(1): 110-121.
- Dicks, M. D., E. Guzman, A. J. Spencer, S. C. Gilbert, B. Charleston, A. V. Hill and M. G. Cottingham (2015). "The relative magnitude of transgene-specific adaptive immune responses induced by human and chimpanzee adenovirus vectors

- differs between laboratory animals and a target species." Vaccine **33**(9): 1121-1128.
- Durrant, T. N., M. T. van den Bosch and I. Hers (2017). "Integrin alphal1beta3 outside-in signaling." Blood **130**(14): 1607-1619.
- Echavarria, M. (2008). "Adenoviruses in immunocompromised hosts." Clin Microbiol Rev **21**(4): 704-715.
- Eichholz, K., T. Bru, T. T. Tran, P. Fernandes, H. Welles, F. J. Mennechet, N. Manel, P. Alves, M. Perreau and E. J. Kremer (2016). "Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-Mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells." PLoS Pathog **12**(9): e1005871.
- EMA (2020) <<https://www.ema.europa.eu/en/news/new-vaccine-prevention-ebola-virus-disease-recommended-approval-european-union>>. Pristupljeno 18. listopada 2020.
- Fausther-Bovendo, H. and G. P. Kobinger (2014). "Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important?" Hum Vaccin Immunother **10**(10): 2875-2884.
- Fedorov, Y., E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W. S. Marshall and A. Khvorova (2006). "Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype." RNA **12**(7): 1188-1196.
- Fujimoto, L. M., R. Roth, J. E. Heuser and S. L. Schmid (2000). "Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells." Traffic **1**(2): 161-171.
- Gaggar, A., D. M. Shayakhmetov and A. Lieber (2003). "CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses." Nat Med **9**(11): 1408-1412.
- Gastaldelli, M., N. Imelli, K. Boucke, B. Amstutz, O. Meier and U. F. Greber (2008). "Infectious adenovirus type 2 transport through early but not late endosomes." Traffic **9**(12): 2265-2278.
- Gazzola, M., C. J. Burckhardt, B. Bayati, M. Engelke, U. F. Greber and P. Koumoutsakos (2009). "A stochastic model for microtubule motors describes the

- in vivo cytoplasmic transport of human adenovirus." PLoS Comput Biol **5**(12): e1000623.
- Gianni, T., V. Gatta and G. Campadelli-Fiume (2010). " α β 3-integrin routes herpes simplex virus to an entry pathway dependent on cholesterol-rich lipid rafts and dynamin2." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(51): 22260-22265.
- Ginsberg, M. H. (2014). "Integrin activation." BMB Rep **47**(12): 655-659.
- Gonzalez-Jamett, A. M., F. Momboisse, V. Haro-Acuna, J. A. Bevilacqua, P. Caviedes and A. M. Cardenas (2013). "Dynamin-2 function and dysfunction along the secretory pathway." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 126.
- Greber, U. F., M. Willetts, P. Webster and A. Helenius (1993). "Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells." Cell **75**(3): 477-486.
- Guan, W. J., Z. Y. Ni, Y. Hu, W. H. Liang, C. Q. Ou, J. X. He, L. Liu, H. Shan, C. L. Lei, D. S. C. Hui, B. Du, L. J. Li, G. Zeng, K. Y. Yuen, R. C. Chen, C. L. Tang, T. Wang, P. Y. Chen, J. Xiang, S. Y. Li, J. L. Wang, Z. J. Liang, Y. X. Peng, L. Wei, Y. Liu, Y. H. Hu, P. Peng, J. M. Wang, J. Y. Liu, Z. Chen, G. Li, Z. J. Zheng, S. Q. Qiu, J. Luo, C. J. Ye, S. Y. Zhu, N. S. Zhong and C. China Medical Treatment Expert Group for (2020). "Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China." N Engl J Med **382**(18): 1708-1720.
- Guo, W. and H. Song (2018). "Development of Gene Therapeutics for Head and Neck Cancer in China: From Bench to Bedside." Hum Gene Ther **29**(2): 180-187.
- Harburger, D. S. and D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 2): 159-163.
- Hartman, Z. C., E. P. Black and A. Amalfitano (2007). "Adenoviral infection induces a multi-faceted innate cellular immune response that is mediated by the toll-like receptor pathway in A549 cells." Virology **358**(2): 357-372.
- Hayer, A., M. Stoeber, C. Bissig and A. Helenius (2010). "Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes." Traffic **11**(3): 361-382.
- Heemskerk, B., T. van Vreeswijk, L. A. Veltrop-Duits, C. C. Sombroek, K. Franken, R. M. Verhoosel, P. S. Hiemstra, D. van Leeuwen, M. E. Rensing, R. E. Toes, M. J.

- van Tol and M. W. Schilham (2006). "Adenovirus-specific CD4+ T cell clones recognizing endogenous antigen inhibit viral replication in vitro through cognate interaction." J Immunol **177**(12): 8851-8859.
- Hendrickx, R., N. Stichling, J. Koelen, L. Kuryk, A. Lipiec and U. F. Greber (2014). "Innate immunity to adenovirus." Hum Gene Ther **25**(4): 265-284.
- Hilleman, M. R. and J. H. Werner (1954). "Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness." Proc Soc Exp Biol Med **85**(1): 183-188.
- Hindley, C. E., F. J. Lawrence and D. A. Matthews (2007). "A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA." Traffic **8**(10): 1313-1322.
- Hoepfner, S., F. Severin, A. Cabezas, B. Habermann, A. Runge, D. Gillyooly, H. Stenmark and M. Zerial (2005). "Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B." Cell **121**(3): 437-450.
- Hong, S. S., L. Karayan, J. Tournier, D. T. Curiel and P. A. Boulanger (1997). "Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells." EMBO J **16**(9): 2294-2306.
- Huang, S., T. Kamata, Y. Takada, Z. M. Ruggeri and G. R. Nemerow (1996). "Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells." J Virol **70**(7): 4502-4508.
- Huotari, J. and A. Helenius (2011). "Endosome maturation." EMBO J **30**(17): 3481-3500.
- Hutnick, N. A., D. Carnathan, K. Demers, G. Makedonas, H. C. Ertl and M. R. Betts (2010). "Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive." Vaccine **28**(8): 1932-1941.
- Iacobelli-Martinez, M. and G. R. Nemerow (2007). "Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses." J Virol **81**(3): 1305-1312.
- Iacobelli-Martinez, M., R. R. Nepomuceno, J. Connolly and G. R. Nemerow (2005). "CD46-utilizing adenoviruses inhibit C/EBPbeta-dependent expression of proinflammatory cytokines." J Virol **79**(17): 11259-11268.

- Joshi, A., J. Tang, M. Kuzma, J. Wagner, B. Mookerjee, J. Filicko, M. Carabasi, N. Flomenberg and P. Flomenberg (2009). "Adenovirus DNA polymerase is recognized by human CD8+ T cells." J Gen Virol **90**(Pt 1): 84-94.
- Kaksonen, M. and A. Roux (2018). "Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(5): 313-326.
- Kalin, S., B. Amstutz, M. Gastaldelli, N. Wolfrum, K. Boucke, M. Havenga, F. DiGennaro, N. Liska, S. Hemmi and U. F. Greber (2010). "Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35." J Virol **84**(10): 5336-5350.
- Kasel, J. A., H. E. Evans, A. Spickard and V. Knight (1963). "Conjunctivitis and enteric infection with adenovirus types 26 and 27: responses to primary, secondary and reciprocal cross-challenges." Am J Hyg **77**: 265-282.
- Kemper, C., A. C. Chan, J. M. Green, K. A. Brett, K. M. Murphy and J. P. Atkinson (2003). "Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype." Nature **421**(6921): 388-392.
- Khan, S., K. Oosterhuis, K. Wunderlich, E. M. Bunnik, M. Bhaggoe, S. Boedhoe, S. Karia, R. D. M. Steenbergen, L. Bosch, J. Serroyen, S. Janssen, H. Schuitemaker, J. Vellinga, G. Scheper, R. Zahn and J. Custers (2017). "Development of a replication-deficient adenoviral vector-based vaccine candidate for the interception of HPV16- and HPV18-induced infections and disease." Int J Cancer **141**(2): 393-404.
- Kirby, I., R. Lord, E. Davison, T. J. Wickham, P. W. Roelvink, I. Kovesdi, B. J. Sutton and G. Santis (2001). "Adenovirus type 9 fiber knob binds to the coxsackie B virus-adenovirus receptor (CAR) with lower affinity than fiber knobs of other CAR-binding adenovirus serotypes." J Virol **75**(15): 7210-7214.
- Koistinen, P. and J. Heino (2002). "The selective regulation of alpha Vbeta 1 integrin expression is based on the hierarchical formation of alpha V-containing heterodimers." J Biol Chem **277**(27): 24835-24841.
- Kotha, P. L., P. Sharma, A. O. Kolawole, R. Yan, M. S. Alghamri, T. L. Brockman, J. Gomez-Cambronero and K. J. Excoffon (2015). "Adenovirus entry from the apical

- surface of polarized epithelia is facilitated by the host innate immune response." PLoS Pathog **11**(3): e1004696.
- Kremer, E. J. and G. R. Nemerow (2015). "Adenovirus tales: from the cell surface to the nuclear pore complex." PLoS Pathog **11**(6): e1004821.
- Lai, C. C., T. P. Shih, W. C. Ko, H. J. Tang and P. R. Hsueh (2020). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges." Int J Antimicrob Agents **55**(3): 105924.
- Lam, E., S. Stein and E. Falck-Pedersen (2014). "Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade." J Virol **88**(2): 974-981.
- Langemeyer, L., F. Frohlich and C. Ungermann (2018). "Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis." Trends Cell Biol **28**(11): 957-970.
- Lee, J. S., S. Mukherjee, J. Y. Lee, A. Saha, J. Chodosh, D. F. Painter and J. Rajaiya (2020). "Entry of Epidemic Keratoconjunctivitis-Associated Human Adenovirus Type 37 in Human Corneal Epithelial Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **61**(10): 50.
- Lefkowitz, E. J., D. M. Dempsey, R. C. Hendrickson, R. J. Orton, S. G. Siddell and D. B. Smith (2018). "Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)." Nucleic Acids Res **46**(D1): D708-D717.
- Lenman, A., A. M. Liaci, Y. Liu, L. Frangsmyr, M. Frank, B. S. Blaum, W. Chai, Podgorski, II, B. Harrach, M. Benko, T. Feizi, T. Stehle and N. Arnberg (2018). "Polysialic acid is a cellular receptor for human adenovirus 52." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(18): E4264-E4273.
- Leopold, P. L. and R. G. Crystal (2007). "Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends." Adv Drug Deliv Rev **59**(8): 810-821.
- Leung, T. K. and M. Brown (2011). "Block in entry of enteric adenovirus type 41 in HEK293 cells." Virus Res **156**(1-2): 54-63.
- Lewis, P. F., M. A. Schmidt, X. Lu, D. D. Erdman, M. Campbell, A. Thomas, P. R. Cieslak, L. D. Grenz, L. Tsaknardis, C. Gleaves, B. Kendall and D. Gilbert (2009).

- "A community-based outbreak of severe respiratory illness caused by human adenovirus serotype 14." J Infect Dis **199**(10): 1427-1434.
- Li, E., D. G. Stupack, S. L. Brown, R. Klemke, D. D. Schlaepfer and G. R. Nemerow (2000). "Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry." J Biol Chem **275**(19): 14729-14735.
- Li, E., D. Stupack, G. M. Bokoch and G. R. Nemerow (1998). "Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases." J Virol **72**(11): 8806-8812.
- Li, E., D. Stupack, R. Klemke, D. A. Cheresh and G. R. Nemerow (1998). "Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase." J Virol **72**(3): 2055-2061.
- Li, H., E. G. Rhee, K. Masek-Hammerman, J. E. Teigler, P. Abbink and D. H. Barouch (2012). "Adenovirus serotype 26 utilizes CD46 as a primary cellular receptor and only transiently activates T lymphocytes following vaccination of rhesus monkeys." J Virol **86**(19): 10862-10865.
- Liu, H., L. Jin, S. B. Koh, I. Atanasov, S. Schein, L. Wu and Z. H. Zhou (2010). "Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks." Science **329**(5995): 1038-1043.
- Liu, J., P. Boehme, W. Zhang, J. Fu, R. Yumul, K. Mese, R. Tsoukas, M. Solanki, M. Kaufmann, R. Lu, A. Schmidtko, A. F. Stewart, A. Lieber and A. Ehrhardt (2018). "Human adenovirus type 17 from species D transduces endothelial cells and human CD46 is involved in cell entry." Sci Rep **8**(1): 13442.
- Liu, X. and R. Marmorstein (2007). "Structure of the retinoblastoma protein bound to adenovirus E1A reveals the molecular basis for viral oncoprotein inactivation of a tumor suppressor." Genes Dev **21**(21): 2711-2716.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2011). "Immune signaling by RIG-I-like receptors." Immunity **34**(5): 680-692.

- Lortat-Jacob, H., E. Chouin, S. Cusack and M. J. van Raaij (2001). "Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions." J Biol Chem **276**(12): 9009-9015.
- Loustalot, F., E. J. Kremer and S. Salinas (2016). "Membrane Dynamics and Signaling of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor." Int Rev Cell Mol Biol **322**: 331-362.
- Lukashev, A. N. and A. A. Zamyatnin, Jr. (2016). "Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives." Biochemistry (Mosc) **81**(7): 700-708.
- Luisoni, S., Greber, U. (2016) Biology of Adenovirus Cell Entry: Receptors, Pathways, Mechanisms. U: Adenoviral Vectors for Gene Therapy (Curiel, D.T., Douglas, J.T., ured.), Academic Press, NewYork/London, str. 27-58.
- Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner and T. Kirchhausen (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." Dev Cell **10**(6): 839-850.
- Mager, I., K. Langel, T. Lehto, E. Eiriksdottir and U. Langel (2012). "The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides." Biochim Biophys Acta **1818**(3): 502-511.
- Maier, O., D. L. Galan, H. Wodrich and C. M. Wiethoff (2010). "An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature." Virology **402**(1): 11-19.
- Majhen, D., H. Calderon, N. Chandra, C. A. Fajardo, A. Rajan, R. Alemany and J. Custers (2014). "Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field." Hum Gene Ther **25**(4): 301-317.
- Majhen, D., J. Nemet, J. Richardson, J. Gabrilovac, M. Hajsig, M. Osmak, M. Eloit and A. Ambriovic-Ristov (2009). "Differential role of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in internalization and transduction efficacies of wild type and RGD4C fiber-modified adenoviruses." Virus Res **139**(1): 64-73.
- Majhen, D., N. Stojanović, T. Špeljko, A. Brozović, T. De Zan, M. Osmak and A. Ambriović-Ristov (2011). "Increased expression of the coxsackie and adenovirus receptor downregulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin expression and reduces cell adhesion and migration." Life Sci **89**(7-8): 241-249.

- Marjomaki, V., V. Pietiainen, H. Matilainen, P. Upla, J. Ivaska, L. Nissinen, H. Reunanen, P. Huttunen, T. Hyypia and J. Heino (2002). "Internalization of echovirus 1 in caveolae." J Virol **76**(4): 1856-1865.
- Martin-Fernandez, M., S. V. Longshaw, I. Kirby, G. Santis, M. J. Tobin, D. T. Clarke and G. R. Jones (2004). "Adenovirus type-5 entry and disassembly followed in living cells by FRET, fluorescence anisotropy, and FLIM." Biophys J **87**(2): 1316-1327.
- Marttila, M., D. Persson, D. Gustafsson, M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, G. Wadell and N. Arnberg (2005). "CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7." J Virol **79**(22): 14429-14436.
- Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 121-132.
- Mayor, S., R. G. Parton and J. G. Donaldson (2014). "Clathrin-independent pathways of endocytosis." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(6).
- McCluskey, A., J. A. Daniel, G. Hadzic, N. Chau, E. L. Clayton, A. Mariana, A. Whiting, N. N. Gorgani, J. Lloyd, A. Quan, L. Moshkanbaryans, S. Krishnan, S. Perera, M. Chircop, L. von Kleist, A. B. McGeachie, M. T. Howes, R. G. Parton, M. Campbell, J. A. Sakoff, X. Wang, J. Y. Sun, M. J. Robertson, F. M. Deane, T. H. Nguyen, F. A. Meunier, M. A. Cousin and P. J. Robinson (2013). "Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis." Traffic **14**(12): 1272-1289.
- McMahon, H. T. and E. Boucrot (2011). "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 517-533.
- Meier, O. and U. F. Greber (2004). "Adenovirus endocytosis." J Gene Med **6 Suppl 1**: S152-163.
- Meier, O., K. Boucke, S. V. Hammer, S. Keller, R. P. Stidwill, S. Hemmi and U. F. Greber (2002). "Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake." J Cell Biol **158**(6): 1119-1131.

- Mercer, J. and A. Helenius (2009). "Virus entry by macropinocytosis." Nat Cell Biol **11**(5): 510-520.
- Mercer, J., M. Schelhaas and A. Helenius (2010). "Virus entry by endocytosis." Annu Rev Biochem **79**: 803-833.
- Miller, A. M. (2011). "Role of IL-33 in inflammation and disease." J Inflamm (Lond) **8**(1): 22.
- Milligan, I. D., M. M. Gibani, R. Sewell, E. A. Clutterbuck, D. Campbell, E. Plested, E. Nuthall, M. Voysey, L. Silva-Reyes, M. J. McElrath, S. C. De Rosa, N. Frahm, K. W. Cohen, G. Shukarev, N. Orzabal, W. van Duijnhoven, C. Truyers, N. Bachmayer, D. Splinter, N. Samy, M. G. Pau, H. Schuitemaker, K. Luhn, B. Callendret, J. Van Hoof, M. Douoguih, K. Ewer, B. Angus, A. J. Pollard and M. D. Snape (2016). "Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26- and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial." JAMA **315**(15): 1610-1623.
- Minamitani, T., D. Iwakiri and K. Takada (2011). "Adenovirus virus-associated RNAs induce type I interferon expression through a RIG-I-mediated pathway." J Virol **85**(8): 4035-4040.
- Mittereder, N., K. L. March and B. C. Trapnell (1996). "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy." J Virol **70**(11): 7498-7509.
- Miyazawa, N., P. L. Leopold, N. R. Hackett, B. Ferris, S. Worgall, E. Falck-Pedersen and R. G. Crystal (1999). "Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors." J Virol **73**(7): 6056-6065.
- Miyazawa, N., R. G. Crystal and P. L. Leopold (2001). "Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein." J Virol **75**(3): 1387-1400.
- Moyer, C. L., E. S. Besser and G. R. Nemerow (2016). "A Single Maturation Cleavage Site in Adenovirus Impacts Cell Entry and Capsid Assembly." J Virol **90**(1): 521-532.

- Mulherkar, N., M. Raaben, J. C. de la Torre, S. P. Whelan and K. Chandran (2011). "The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway." Virology **419**(2): 72-83.
- Nestić, D., Uil, T.G., Ma, J., Roy, S., Vellinga, J., Baker, A.H., Custers, J., Majhen, D. (2019). " $\alpha\beta3$ Integrin is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26." J Virol **93**(1): e01474-18.
- Ni Choileain, S. and A. L. Astier (2012). "CD46 processing: a means of expression." Immunobiology **217**(2): 169-175.
- Nielsen, E., F. Severin, J. M. Backer, A. A. Hyman and M. Zerial (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." Nat Cell Biol **1**(6): 376-382.
- Nociari, M., O. Ocheretina, J. W. Schoggins and E. Falck-Pedersen (2007). "Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator." J Virol **81**(8): 4145-4157.
- Orlandi, P. A. and P. H. Fishman (1998). "Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains." J Cell Biol **141**(4): 905-915.
- Pahl, J. H., D. H. Verhoeven, K. M. Kwappenberg, J. Vellinga, A. C. Lankester, M. J. van Tol and M. W. Schilham (2012). "Adenovirus type 35, but not type 5, stimulates NK cell activation via plasmacytoid dendritic cells and TLR9 signaling." Mol Immunol **51**(1): 91-100.
- Palm, W. (2019). "Metabolic functions of macropinocytosis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **374**(1765): 20180285.
- Pante, N. and M. Kann (2002). "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm." Mol Biol Cell **13**(2): 425-434.
- Paradžik, M., J. D. Humphries, N. Stojanović, D. Nestić, D. Majhen, A. Dekanić, I. Samaržija, D. Sedda, I. Weber, M. J. Humphries and A. Ambriović-Ristov (2020). "KANK2 Links α V β 5 Focal Adhesions to Microtubules and Regulates Sensitivity to Microtubule Poisons and Cell Migration." Front Cell Dev Biol **8**: 125.

- Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial and A. Helenius (2004). "Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic." Cell **118**(6): 767-780.
- Petitclerc, E., S. Stromblad, T. L. von Schalscha, F. Mitjans, J. Piulats, A. M. Montgomery, D. A. Cheresh and P. C. Brooks (1999). "Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival." Cancer Res **59**(11): 2724-2730.
- Popova, N. V., I. E. Deyev and A. G. Petrenko (2013). "Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins." Acta Naturae **5**(3): 62-73.
- Puntener, D., M. F. Engelke, Z. Ruzsics, S. Strunze, C. Wilhelm and U. F. Greber (2011). "Stepwise loss of fluorescent core protein V from human adenovirus during entry into cells." J Virol **85**(1): 481-496.
- Raschperger, E., J. Thyberg, S. Pettersson, L. Philipson, J. Fuxe and R. F. Pettersson (2006). "The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis." Exp Cell Res **312**(9): 1566-1580.
- Rajala, M. S., R. V. Rajala, R. A. Astley, A. L. Butt and J. Chodosh (2005). "Corneal cell survival in adenovirus type 19 infection requires phosphoinositide 3-kinase/Akt activation." J Virol **79**(19): 12332-12341.
- Ricobaraza, A., M. Gonzalez-Aparicio, L. Mora-Jimenez, S. Lumbreras and R. Hernandez-Alcoceba (2020). "High-Capacity Adenoviral Vectors: Expanding the Scope of Gene Therapy." Int J Mol Sci **21**(10).
- Roelvink, P. W., A. Lizonova, J. G. Lee, Y. Li, J. M. Bergelson, R. W. Finberg, D. E. Brough, I. Kovesdi and T. J. Wickham (1998). "The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F." J Virol **72**(10): 7909-7915.
- Rogee, S., E. Grellier, C. Bernard, A. Loyens, J. C. Beauvillain, C. D'Halluin J and M. Colin (2007). "Intracellular trafficking of a fiber-modified adenovirus using lipid raft/caveolae endocytosis." Mol Ther **15**(11): 1963-1972.

- Ros-Baro, A., C. Lopez-Iglesias, S. Peiro, D. Bellido, M. Palacin, A. Zorzano and M. Camps (2001). "Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12050-12055.
- Rosen, L., S. Baron and J. A. Bell (1961). "Four newly recognized adenoviruses." Proc Soc Exp Biol Med **107**: 434-437.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott and T. G. Ward (1953). "Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture." Proc Soc Exp Biol Med **84**(3): 570-573.
- Ruuskanen O, Meurman O, Akusjärvi G. (2002) Adenoviruses. U: Clinical Virology, 2. izd. (Richman, D. D., Whitley, R. J., Hayden, F. G., ured.), ASM Press, Washington, str. 515–535.
- Samaržija, I., A. Dekanić, J. D. Humphries, M. Paradžik, N. Stojanović, M. J. Humphries and A. Ambriović-Ristov (2020). "Integrin Crosstalk Contributes to the Complexity of Signalling and Unpredictable Cancer Cell Fates." Cancers (Basel) **12**(7).
- Sampath, P. and T. D. Pollard (1991). "Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments." Biochemistry **30**(7): 1973-1980.
- Saphire, A. C., T. Guan, E. C. Schirmer, G. R. Nemerow and L. Gerace (2000). "Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70." J Biol Chem **275**(6): 4298-4304.
- Scherer, J. and R. B. Vallee (2015). "Conformational changes in the adenovirus hexon subunit responsible for regulating cytoplasmic dynein recruitment." J Virol **89**(2): 1013-1023.
- Scherer, J., J. Yi and R. B. Vallee (2014). "PKA-dependent dynein switching from lysosomes to adenovirus: a novel form of host-virus competition." J Cell Biol **205**(2): 163-177.
- Scherer, J., J. Yi and R. B. Vallee (2020). "Role of cytoplasmic dynein and kinesins in adenovirus transport." FEBS Lett **594**(12): 1838-1847.

- Segerman, A., J. P. Atkinson, M. Marttila, V. Dennerquist, G. Wadell and N. Arnberg (2003). "Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor." J Virol **77**(17): 9183-9191.
- Shayakhmetov, D. M. and A. Lieber (2000). "Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain." J Virol **74**(22): 10274-10286.
- Shayakhmetov, D. M., Z. Y. Li, V. Ternovoi, A. Gaggar, H. Gharwan and A. Lieber (2003). "The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses." J Virol **77**(6): 3712-3723.
- Short, J. J., C. Vasu, M. J. Holterman, D. T. Curiel and A. Pereboev (2006). "Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors." Virus Res **122**(1-2): 144-153.
- Smart, E. J. and R. G. Anderson (2002). "Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae." Methods Enzymol **353**: 131-139.
- Smith, A., F. Santoro, G. Di Lullo, L. Dagna, A. Verani and P. Lusso (2003). "Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6." Blood **102**(8): 2877-2884.
- Smith, T. A., N. Idamakanti, M. L. Rollence, J. Marshall-Neff, J. Kim, K. Mulgrew, G. R. Nemerow, M. Kaleko and S. C. Stevenson (2003). "Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice." Hum Gene Ther **14**(8): 777-787.
- Stasiak, A. C. and T. Stehle (2020). "Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view." Med Microbiol Immunol **209**(3): 325-333.
- Stichling, N., M. Suomalainen, J. W. Flatt, M. Schmid, M. Pacesa, S. Hemmi, W. Jungraithmayr, M. D. Maler, M. A. Freudenberg, A. Pluckthun, T. May, M. Koster, G. Fejer and U. F. Greber (2018). "Lung macrophage scavenger receptor SR-A6 (MARCO) is an adenovirus type-specific virus entry receptor." PLoS Pathog **14**(3): e1006914.
- Strunze, S., M. F. Engelke, I. H. Wang, D. Puntener, K. Boucke, S. Schleich, M. Way, P. Schoenenberger, C. J. Burckhardt and U. F. Greber (2011). "Kinesin-1-

- mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection." Cell Host Microbe **10**(3): 210-223.
- Suomalainen, M., S. Luisoni, K. Boucke, S. Bianchi, D. A. Engel and U. F. Greber (2013). "A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells." J Virol **87**(22): 12367-12379.
- Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz and T. A. Springer (2002). "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." Cell **110**(5): 599-511.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.
- Talmadge, E. J. and Cowan, K. H. (2020) Gene Therapy in Oncology. U: Abeloff's Clinical Oncology (Niederhuber, J. E., Armitage, J. O., Kastan, M. B., Doroshow, J. H., Tepper, J. E., ured.), 6. izdanje, Elsevier, Amsterdam, str. 470-485.e5.
- Tamanini, A., E. Nicolis, A. Bonizzato, V. Bezzetti, P. Melotti, B. M. Assael and G. Cabrini (2006). "Interaction of adenovirus type 5 fiber with the coxsackievirus and adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells." J Virol **80**(22): 11241-11254.
- Tang, J., M. Olive, R. Pulmanusahakul, M. Schnell, N. Flomenberg, L. Eisenlohr and P. Flomenberg (2006). "Human CD8+ cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins." Virology **350**(2): 312-322.
- Teigler, J. E., J. C. Kagan and D. H. Barouch (2014). "Late endosomal trafficking of alternative serotype adenovirus vaccine vectors augments antiviral innate immunity." J Virol **88**(18): 10354-10363.
- Tollefson, A. E., B. Ying, K. Doronin, P. D. Sidor and W. S. Wold (2007). "Identification of a new human adenovirus protein encoded by a novel late I-strand transcription unit." J Virol **81**(23): 12918-12926.
- Tomasec, P., E. C. Y. Wang, V. Groh, T. Spies, B. P. McSharry, R. J. Aicheler, R. J. Stanton and G. W. G. Wilkinson (2007). "Adenovirus vector delivery stimulates natural killer cell recognition." J Gen Virol **88**(Pt 4): 1103-1108.

- Trentin, J. J., Y. Yabe and G. Taylor (1962). "The quest for human cancer viruses." Science **137**(3533): 835-841.
- Trinh, H. V., G. Lesage, V. Chennampampil, B. Vollenweider, C. J. Burckhardt, S. Schauer, M. Havenga, U. F. Greber and S. Hemmi (2012). "Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection." J Virol **86**(3): 1623-1637.
- Trotman, L. C., N. Mosberger, M. Fornerod, R. P. Stidwill and U. F. Greber (2001). "Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1." Nat Cell Biol **3**(12): 1092-1100.
- Veltrop-Duits, L. A., B. Heemskerk, C. C. Sombroek, T. van Vreeswijk, S. Gubbels, R. E. Toes, C. J. Melief, K. L. Franken, M. Havenga, M. J. van Tol and M. W. Schilham (2006). "Human CD4+ T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus." Eur J Immunol **36**(9): 2410-2423.
- Veesler, D., K. Cupelli, M. Burger, P. Graber, T. Stehle and J. E. Johnson (2014). "Single-particle EM reveals plasticity of interactions between the adenovirus penton base and integrin alphaVbeta3." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(24): 8815-8819.
- von Kleist, L., W. Stahlschmidt, H. Bulut, K. Gromova, D. Puchkov, M. J. Robertson, K. A. MacGregor, N. Tomilin, A. Pechstein, N. Chau, M. Chircop, J. Sakoff, J. P. von Kries, W. Saenger, H. G. Krausslich, O. Shupliakov, P. J. Robinson, A. McCluskey and V. Haucke (2011). "Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition." Cell **146**(3): 471-484.
- Wang, H., Z. Y. Li, Y. Liu, J. Persson, I. Beyer, T. Moller, D. Koyuncu, M. R. Drescher, R. Strauss, X. B. Zhang, J. K. Wahl, 3rd, N. Urban, C. Drescher, A. Hemminki, P. Fender and A. Lieber (2011). "Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14." Nat Med **17**(1): 96-104.
- Wang, I. H., M. Suomalainen, V. Andriasyan, S. Kilcher, J. Mercer, A. Neef, N. W. Luedtke and U. F. Greber (2013). "Tracking viral genomes in host cells at single-molecule resolution." Cell Host Microbe **14**(4): 468-480.

- Wang, K., S. Huang, A. Kapoor-Munshi and G. Nemerow (1998). "Adenovirus internalization and infection require dynamin." J Virol **72**(4): 3455-3458.
- Watkinson, R. E., W. A. McEwan, J. C. Tam, M. Vaysburd and L. C. James (2015). "TRIM21 Promotes cGAS and RIG-I Sensing of Viral Genomes during Infection by Antibody-Opsonized Virus." PLoS Pathog **11**(10): e1005253.
- Wen, H., E. A. Miao and J. P. Ting (2013). "Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation." Immunity **39**(3): 432-441.
- WHO (2020) <file:///A:/Downloads/novel-coronavirus-landscape-covid-191cf012d2866d4102b9430ef02369d152.pdf>. Pristupljeno 8. studenog 2020.
- Wiethoff, C. M., H. Wodrich, L. Gerace and G. R. Nemerow (2005). "Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly." J Virol **79**(4): 1992-2000.
- Windheim, M., J. H. Southcombe, E. Kremmer, L. Chaplin, D. Urlaub, C. S. Falk, M. Claus, J. Mihm, M. Braithwaite, K. Dennehy, H. Renz, M. Sester, C. Watzl and H. G. Burgert (2013). "A unique secreted adenovirus E3 protein binds to the leukocyte common antigen CD45 and modulates leukocyte functions." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(50): E4884-4893.
- Wodrich, H., D. Henaff, B. Jammart, C. Segura-Morales, S. Seelmeir, O. Coux, Z. Ruzsics, C. M. Wiethoff and E. J. Kremer (2010). "A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry." PLoS Pathog **6**(3): e1000808.
- Wojnicz, D., J. Bar and S. Jankowski (2002). "[The role of membrane glycoproteins CD46, CD55 and CD59 in protection of tumor cells against complement lysis]." Postepy Hig Med Dosw **56**(5): 603-616.
- Wold, W. S. (1993). "Adenovirus genes that modulate the sensitivity of virus-infected cells to lysis by TNF." J Cell Biochem **53**(4): 329-335.
- Wold, W. S. and K. Toth (2013). "Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy." Curr Gene Ther **13**(6): 421-433.
- Wu, E., L. Pache, D. J. Von Seggern, T. M. Mullen, Y. Mikyas, P. L. Stewart and G. R. Nemerow (2003). "Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction." J Virol **77**(13): 7225-7235.

- Wu, W., J. L. Booth, E. S. Duggan, K. B. Patel, K. M. Coggeshall and J. P. Metcalf (2010). "Human lung innate immune cytokine response to adenovirus type 7." J Gen Virol **91**(Pt 5): 1155-1163.
- Xia, Y., X. Li and W. Sun (2020). "Applications of Recombinant Adenovirus-p53 Gene Therapy for Cancers in the Clinic in China." Curr Gene Ther **20**(2): 127-141.
- Yabe, Y., J. J. Trentin and G. Taylor (1962). "Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of age and of virus dose." Proc Soc Exp Biol Med **111**: 343-344.
- Yamaguchi, T., K. Kawabata, N. Koizumi, F. Sakurai, K. Nakashima, H. Sakurai, T. Sasaki, N. Okada, K. Yamanishi and H. Mizuguchi (2007). "Role of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by serotype 5 adenoviral vectors." Hum Gene Ther **18**(8): 753-762.
- Ying, B., A. E. Tollefson and W. S. Wold (2010). "Identification of a previously unrecognized promoter that drives expression of the UXP transcription unit in the human adenovirus type 5 genome." J Virol **84**(21): 11470-11478.
- Yousuf, M. A., X. Zhou, S. Mukherjee, A. V. Chintakuntlawar, J. Y. Lee, M. Ramke, J. Chodosh and J. Rajaiya (2013). "Caveolin-1 associated adenovirus entry into human corneal cells." PLoS One **8**(10): e77462.
- Yu, X., D. Veessler, M. G. Campbell, M. E. Barry, F. J. Asturias, M. A. Barry and V. S. Reddy (2017). "Cryo-EM structure of human adenovirus D26 reveals the conservation of structural organization among human adenoviruses." Sci Adv **3**(5): e1602670.
- Zhang, C. and D. Zhou (2016). "Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer." Hum Vaccin Immunother **12**(8): 2064-2074.
- Zhou, J., J. Scherer, J. Yi and R. B. Vallee (2018). "Role of kinesins in directed adenovirus transport and cytoplasmic exploration." PLoS Pathog **14**(5): e1007055.
- Zhou, X., M. Ramke, A. V. Chintakuntlawar, J. Y. Lee, J. Rajaiya and J. Chodosh (2017). "Role of MyD88 in adenovirus keratitis." Immunol Cell Biol **95**(1): 108-116.

Zhu, J., X. Huang and Y. Yang (2007). "Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways." J Virol **81**(7): 3170-3180.

Zhu, J., X. Huang and Y. Yang (2008). "A critical role for type I IFN-dependent NK cell activation in innate immune elimination of adenoviral vectors in vivo." Mol Ther **16**(7): 1300-1307.

Zubieta, C., G. Schoehn, J. Chroboczek and S. Cusack (2005). "The structure of the human adenovirus 2 penton." Mol Cell **17**(1): 121-135.

8. SAŽETAK

8. SAŽETAK

Vektori temeljeni na adenovirusima imaju potencijalnu translacijsku i komercijalnu vrijednost, a trenutno se istražuju kao vektori za gensku terapiju i vakcinaciju. Različiti tipovi adenovirusa čovjeka imaju različitu seroprevalenciju u populaciji ljudi, a visoka seroprevalencija može ograničiti učinkovitost vektora. Upravo je visoka seroprevalencija jedan od nedostataka adenovirusa čovjeka serotipa 5 (HAdV5) na temelju kojeg je konstruiran najčešće korišteni adenoviralni vektor, zbog čega sve veću primjenu imaju serotipovi adenovirusa čovjeka koji se u populaciji ljudi nalaze u niskoj seroprevalenciji. Jedan od njih je i adenovirus čovjeka serotipa 26 (HAdV26), koji se već nalazi u više od 30 kliničkih studija. Imunogeničnost HAdV26 *in vivo* je dobro opisana, međutim osnovna biologija ovog virusa još je uvijek nedovoljno istražena.

Stoga je glavni cilj ove doktorske disertacije bio istražiti način na koji HAdV26 inficira stanice epitela čovjeka. Prethodno je pokazano da HAdV26 ne koristi CAR i CD46 kao receptore, već infekcija HAdV26 ovisi o αv integrinu. Kako su integrini heterodimeri α i β podjedinica, u ovom je radu detaljnije istraženo koji je točno heterodimer αv integrina receptor za HAdV26. Konstrukcijom klonova s povećanom ekspresijom αv ili $\beta 3$ integrina pokazano je da je $\alpha v\beta 3$ integrin receptor za HAdV26 u epitelnim stanicama čovjeka jer njegova povećana ekspresija omogućuje povećanu infekciju s HAdV26 te tijekom vezanja HAdV26 kolokalizira s $\alpha v\beta 3$ integrinom eksprimiranim na površini stanica. Adenovirusi ulaze u stanice endocitozom pa je u ovom radu ispitan utjecaj dinamina-2, klatrina i kaveolina na ulazak HAdV26, ključnih molekula u prethodno opisanim tipovima endocitoze koje adenovirusi koriste za ulazak u stanice. Ulazak HAdV26 ovisan je o dinaminu-2 čije smanjenje ekspresije ili aktivnosti smanjuje i infekciju s HAdV26. Smanjenje ekspresije klatrina povećava infekciju s HAdV26 uslijed povećane ekspresije $\alpha v\beta 3$ integrina u A549 staničnoj liniji, dok inhibicija aktivnosti klatrinom posredovane endocitoze zaustavlja unutarstanično putovanje HAdV26. Smanjenje ekspresije kaveolina-1 ima različit utjecaj na uspješnost transdukcije HAdV26 u stanicama s nižom i višom ekspresijom $\alpha v\beta 3$ integrina. U stanicama s nižom ekspresijom $\alpha v\beta 3$ integrina, nakon utišavanja kaveolina-1 dolazi do povećanja ekspresije $\alpha v\beta 3$ integrina, ali to povećanje nema značajan utjecaj na infekciju s HAdV26. Suprotno tome, u stanicama s višom ekspresijom $\alpha v\beta 3$ integrina dolazi do

smanjenja uspješnosti infekcije s HAdV26 nakon utišavanja kaveolina-1, što upućuje na to da $\alpha\beta 3$ integrin usmjerava HAdV26 na kaveolinom-1 posredovanu endocitozu.

Unutarstanično putovanje HAdV26 značajno se razlikuje u odnosu na ono HAdV5 i HAdV35 (adenovirus čovjeka serotipa 35). Za razliku od HAdV5, HAdV26 ne pokazuje usmjereno i brzo putovanje prema jezgri stanice s ciljem dopreme genoma, što upućuje na njegovo zaostajanje u nekoj od endocitoznih organela. Potencijalno mjesto unutarstaničnog nakupljanja HAdV26 jesu kasni endosomi i/ili lizosomi, jer s povećanjem vremena nakon infekcije dolazi do povećanog udjela HAdV26 koji kolokaliziraju s LAMP1, biljekom kasnih endosoma i lizosoma.

Uslijed razlika u infekciji, ponajviše različitog unutarstaničnog putovanja, HAdV26 potiče drugačiji profil ekspresije gena uključenih u urođeni imunosni odgovor u odnosu na HAdV5 i HAdV35. Iako nakon infekcije s HAdV26 dolazi do povećane ekspresije gena uključenih u aktivaciju upalnih procesa kao su IL-6 i geni inflammasoma, nije pokazano značajno izlučivanje IL-6 i IL-8.

Rezultati opisani u ovoj doktorskoj disertaciji doprinose boljem razumijevanju biologije HAdV26, kao i mehanizama koje adenovirusi koriste prilikom infekcije stanica epitela čovjeka te omogućuju daljnji napredak u razvoju sigurnijih i učinkovitijih vektora temeljenih na HAdV26.

9. SUMMARY

9. SUMMARY

Adenovirus-based vectors have been identified as good candidates for potential translational and commercial use, and are currently being investigated as vectors for gene therapy and vaccination. Different types of human adenovirus have different seroprevalence in the human population, and high seroprevalence may limit the efficacy of the vector. One of the disadvantages of human adenovirus serotype 5 (HAdV5), the most commonly used adenoviral vector, is its high seroprevalence. Therefore, serotypes of adenoviruses with low seroprevalence in the human population are increasingly investigated as vectors. One such type is human adenovirus 26 (HAdV26), which is already found in more than 30 clinical studies. The immunogenicity of HAdV26 *in vivo* has been extensively studied, however, the basic biology of this virus is still unclear.

Therefore, the main goal of this doctoral dissertation was to investigate principles of HAdV26 infection of human epithelial cells. It has been previously shown that HAdV26 does not use CAR and CD46 as receptors, but rather depends on αv integrin for HAdV26 infection. Giving the fact that integrins are heterodimers of α and β subunits, focus of this work was to determine which particular heterodimer of the αv integrin receptor is required for HAdV26 entry. The construction of clones with increased αv or $\beta 3$ integrin expression have showed that increased expression of $\alpha v\beta 3$ integrin allows for increased HAdV26 infection indicating that $\alpha v\beta 3$ integrin is required receptor for HAdV26 in human epithelial cells.. In addition, it has been demonstrated that during binding, HAdV26 colocalizes with $\alpha v\beta 3$ integrin expressed on the cell surface.

Adenoviruses enter cells by endocytosis, hence, in this work, we examined the influence of key molecules that play role in previously described types of endocytosis, dynamin-2, clathrin and caveolin on HAdV26 entry. The reduction in expression or activity of dynamin-2 reduces HAdV26 infection, which indicates that HAdV26 entry dependent on dynamin-2 protein. On the contrary, decreased clathrin expression increases HAdV26 infection, due to increased $\alpha v\beta 3$ integrin expression in the A549 cell line, while inhibition of clathrin-mediated endocytosis ceases intracellular pathway of HAdV26. Decreased expression of caveolin-1 showed different influence on HAdV26 infection between cells with lower and higher expression of $\alpha v\beta 3$ integrin. In cells with lower $\alpha v\beta 3$ integrin expression, silencing of caveolin-1 induces an increase

in $\alpha\beta3$ integrin expression. However, this increase in $\alpha\beta3$ integrin expression has no significant effect on HAdV26 infection. In contrast, in cells with higher $\alpha\beta3$ integrin expression, lower HAdV26 infection efficiency is observed after silencing of caveolin-1, suggesting that $\alpha\beta3$ integrin directs HAdV26 to caveolin-1-mediated endocytosis.

The endocytic pathway of HAdV26 differs significantly from that of HAdV5 and HAdV35 (human adenovirus serotype 35). Unlike HAdV5, HAdV26 does not show a directed and rapid movement toward the cell nucleus with the goal for genome delivery, suggesting tarrying in some of the endocytic organelles. Moreover, potential sites of intracellular accumulation of HAdV26 are late endosomes and/or lysosomes, since increasing time after infection confirm increased proportion of HAdV26 that colocalizes LAMP1, a marker of late endosomes and lysosomes.

Due to the differences in infection, mostly in intracellular pathway, HAdV26 promotes a different expression profile of genes involved in the innate immune response, compared to HAdV5 and HAdV35. Although HAdV26 infection induces an increase in the expression of genes involved in the activation of inflammatory processes, such as IL-6 and inflammasome genes, no significant secretion of IL-6 and IL-8 has been shown.

The results described in this doctoral dissertation contribute to a better understanding of the HAdV26 biology, and offers detailed mechanisms on how adenovirus infect human epithelial cell, which consequently allows further progress in the development of safer and more effective HAdV26-based vectors.

10. PRILOZI

Prilog 1. Ekspresija molekula uključenih u inflammasom u A549 staničnoj liniji nakon infekcije s HAdV26 određena pomoću RT2 PCR Profiler Array metodom Real Time PCR. Geni čija ekspresija nije prikazana na Slici 46 ili u Tablici 20 nisu detektirani. Nazivi gena navedeni su na engleskom jeziku.

| Oznaka | Naziv gena na engleskom jeziku |
|-----------------|--|
| AIM2 | <i>Absent in melanoma 2</i> |
| BCL2 | <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i> |
| BCL2L1 | <i>BCL2-like 1</i> |
| BIRC2 | <i>Baculoviral IAP repeat containing 2</i> |
| BIRC3 | <i>Baculoviral IAP repeat containing 3</i> |
| CARD18 | <i>Caspase recruitment domain family, member 18</i> |
| CARD6 | <i>Caspase recruitment domain family, member 6</i> |
| CASP1 | <i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)</i> |
| CASP5 | <i>Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase</i> |
| CASP8 | <i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i> |
| CCL2 | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> |
| CCL5 | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> |
| CCL7 | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 7</i> |
| CD40LG | <i>CD40 ligand</i> |
| CFLAR | <i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i> |
| CHUK | <i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i> |
| CIITA | <i>Class II, major histocompatibility complex, transactivator</i> |
| CTSB | <i>Cathepsin B</i> |
| CXCL1 | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)</i> |
| CXCL2 | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i> |
| FADD | <i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i> |
| HSP90AA1 | <i>Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1</i> |
| HSP90AB1 | <i>Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1</i> |
| HSP90B1 | <i>Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i> |
| IFNB1 | <i>Interferon, beta 1, fibroblast</i> |
| IFNG | <i>Interferon, gamma</i> |
| IKBKB | <i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i> |
| IKBKG | <i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i> |
| IL12A | <i>Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)</i> |
| IL12B | <i>Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)</i> |
| IL18 | <i>Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)</i> |
| IL1B | <i>Interleukin 1, beta</i> |
| IL33 | <i>Interleukin 33</i> |
| IL6 | <i>Interleukin 6 (interferon, beta 2)</i> |
| IRAK1 | <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i> |
| IRF1 | <i>Interferon regulatory factor 1</i> |
| IRF2 | <i>Interferon regulatory factor 2</i> |
| MAP3K7 | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i> |
| MAPK1 | <i>Mitogen-activated protein kinase 1</i> |
| MAPK11 | <i>Mitogen-activated protein kinase 11</i> |
| MAPK12 | <i>Mitogen-activated protein kinase 12</i> |
| MAPK13 | <i>Mitogen-activated protein kinase 13</i> |
| MAPK3 | <i>Mitogen-activated protein kinase 3</i> |
| MAPK8 | <i>Mitogen-activated protein kinase 8</i> |
| MAPK9 | <i>Mitogen-activated protein kinase 9</i> |
| MEFV | <i>Mediterranean fever</i> |
| MYD88 | <i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i> |

| | |
|----------------|--|
| NAIP | <i>NLR family, apoptosis inhibitory protein</i> |
| NFKB1 | <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i> |
| NFKBIA | <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i> |
| NFKBIB | <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta</i> |
| NLRC4 | <i>NLR family, CARD domain containing 4</i> |
| NLRC5 | <i>NLR family, CARD domain containing 5</i> |
| NLRP1 | <i>NLR family, pyrin domain containing 1</i> |
| NLRP12 | <i>NLR family, pyrin domain containing 12</i> |
| NLRP3 | <i>NLR family, pyrin domain containing 3</i> |
| NLRP4 | <i>NLR family, pyrin domain containing 4</i> |
| NLRP5 | <i>NLR family, pyrin domain containing 5</i> |
| NLRP6 | <i>NLR family, pyrin domain containing 6</i> |
| NLRP9 | <i>NLR family, pyrin domain containing 9</i> |
| NLRX1 | <i>NLR family member X1</i> |
| NOD1 | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1</i> |
| NOD2 | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i> |
| P2RX7 | <i>Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7</i> |
| PANX1 | <i>Pannexin 1</i> |
| PEA15 | <i>Phosphoprotein enriched in astrocytes 15</i> |
| PSTPIP1 | <i>Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1</i> |
| PTGS2 | <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i> |
| PYCARD | <i>PYD and CARD domain containing</i> |
| PYDC1 | <i>PYD (pyrin domain) containing 1</i> |
| MOK | <i>Renal tumor antigen</i> |
| RELA | <i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i> |
| RIPK2 | <i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i> |
| SUGT1 | <i>SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)</i> |
| TAB1 | <i>TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1</i> |
| TAB2 | <i>TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2</i> |
| TIRAP | <i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i> |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TNFSF11 | <i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11</i> |
| TNFSF14 | <i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14</i> |
| TNFSF4 | <i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4</i> |
| TRAF6 | <i>TNF receptor-associated factor 6</i> |
| TXNIP | <i>Thioredoxin interacting protein</i> |
| XIAP | <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i> |
| ACTB | <i>Actin, beta</i> |
| B2M | <i>Beta-2-microglobulin</i> |
| GAPDH | <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> |
| HPRT1 | <i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> |
| RPLP0 | <i>Ribosomal protein, large, P0</i> |

11. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

11. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

Rođen sam 1991. u Čakovcu. Nakon završetka osnovne škole i gimnazije, upisao sam preddiplomski studij Biotehnologije i diplomski studij Molekularne biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao sam 2015. i time stekao zvanje magistra inženjera molekularne biotehnologije. Diplomski rad naslova „Određivanje prisutnosti disulfidnih veza u NGR preusmjeravajućem slijedu ugrađenom u vlakno adenovirusnog vektora“ izradio sam u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Dragomire Majhen i izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov. Zatim sam zaposlen kao mladi istraživač u trajanju od jedne godine na projektu Europskog socijalnog fonda „Jačanje konkurentnosti hrvatskih znanstvenika/ica u području molekularne biotehnologije“, voditeljice projekta: doc. dr. sc. Anamarije Štafa u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U listopadu 2015. zaposlen sam u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala kao znanstveni asistent te sam upisao Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti. Izradu doktorske disertacije započeo sam u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razumijevanje puta ulaska adenovirusa tipa 26 u stanicu: način poboljšanja vektora za vakcinaciju“ pod mentorstvom dr. sc. Dragomire Majhen. Kao istraživač sudjelovao sam i u bilateralnom projektu s Republikom Slovenijom „Određivanje biokompatibilnosti molibdenovih i volframovih nanočestica - mjerenje citotoksičnosti i upalnog odgovora u *in vitro* kulturi stanica čovjeka“, voditeljice projekta dr. sc. Dragomire Majhen, u sklopu kojeg sam proveo i tjedan dana na Institutu Jožef Stefan u Ljubljani u grupi suvoditeljice projekta prof. dr. sc. Maje Remškar. Kao istraživač trenutno sudjelujem u istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost „Endocitoza adenovirusa i urođeni imunوسي odgovor“, voditeljice projekta dr. sc. Dragomire Majhen. Dosad sam koautor četiri znanstvena rada, devetnaest sažetaka na međunarodnim i domaćim kongresima, sudjelovao sam osobno na sedam kongresa i četiri radionice, a na kongresu *Power of Viruses* koji se održao u svibnju 2018. u Poreču osvojio sam nagradu „*The FEBS Journal Poster Prize*“ za najbolji poster (Nestić, D., Uil, T., Ma, J., Soumitra, R., Velinga, J., Baker, A., Custer, J., Majhen, D.: *Human adenovirus type 26 uses av integrin for infection of human epithelial cells.*). U sklopu stipendije francuske vlade za kratkotrajni boravak u Republici Francuskoj 2017. sam boravio tri tjedna na Institutu Gustave Roussy u

Villejuifu u Francuskoj u grupi dr. sc. Karima Benihouda, a u sklopu stipendije AMAC-UK (*Association of Alumni and Friends of Croatian Universities in the United Kingdom*) za kratkotrajni boravak 2019. proveo sam dva tjedna na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Cardiffu u Ujedinjenom Kraljevstvu u grupi dr. sc. Alana L. Parkera. 2019. dobio sam financiranje Zaklade Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti za projekt „Utjecaj inhibicije klatrinom posredovane endocitoze na infekciju adenovirusom tipa 26“. Od 2019. predstavnik sam asistentata Zavoda za molekularnu biologiju u Vijeću asistentata te u Vijeću Zavoda za molekularnu biologiju. Kao neposredni voditelj sudjelovao sam u mentoriranju četiri diplomskih rada i jedne laboratorijske prakse. Aktivno sam sudjelovao u popularizaciji znanosti kroz sudjelovanje s radionicom ili predavanjem na Otvorenim danima Instituta Ruđer Bošković 2017., 2019. i 2020. te radionicom na Europskoj noći istraživača 2019. Član sam Hrvatskog mikrobiološkog društva (*Federation of European Microbiological Societies*), Hrvatskog društva za istraživanje raka (*European Association for Cancer Research*) te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (*Federation of European Biochemical Societies*).

Popis publikacija:

1. **Nestić, D.**; Uil, T.G.; Ma, J.; Roy, S.; Vellinga, J.; Baker, A.H.; Custers, J.; Majhen, D.: $\alpha\beta3$ Integrin is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26. (2019) *J.Virol.*, 93, 1; e01474, 18 doi:10.1128/JVI.01474-18.
2. Hulin-Curtis, S.L.; Davies, J.A.; **Nestić, D.**; Bates, E.A.; Baker, A.T.; Cunliffe, T.G.; Majhen, D.; Chester, J.D.; Parker, A.L.: Identification of folate receptor α (FR α) binding oligopeptides and their evaluation for targeted virotherapy applications. (2020) *Cancer Gene Ther.*, <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0156-0>.
3. Paradžik, M.; Humphries, J.D.; Stojanović, N.; **Nestić, D.**; Majhen, D.; Dekanić, A.; Samaržija, I.; Sedda, D.; Weber, I.; Humphries, M.J.; Ambriović-Ristov, A.: KANK2 Links $\alpha\beta5$ Focal Adhesions to Microtubules and Regulates Sensitivity to Microtubule Poisons and Cell Migration. (2020) *Front. Cell Dev. Biol.* (8): 1-17.

4. Božinović, K.*; **Nestić, D.***; Gradišar Centa, U.; Ambriović Ristov, A.; Dekanić, A.; de Bisschop, L.; Remškar, M.; Majhen, D.: In-vitro toxicity of molybdenum trioxide nanoparticles on human keratinocytes. (2020) Toxicology (444) 152564.

* dijeljeno prvo autorstvo