

Preusmjeravanje adenovirusa tipa 5 na integrin $\alpha 4\beta 1$

Jelušić, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:228201>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tihana Jelušić
Preusmjeravanje adenovirusa tipa 5 na integrin $\alpha_4\beta_1$
Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Preusmjeravanje adenovirusa tipa 5 na integrin $\alpha_4\beta_1$

Tihana Jelušić

Laboratorij za genotoksične agense, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer
Bošković, Zagreb, Hrvatska

Gensko preusmjeravanje Adenovirusa tipa 5 (Ad5) ugradnjom sljedova u vlakno bi trebalo omogućiti ciljani unos gena. Cilj je ovog istraživanja konstruirati replikacijski defektan adenovirusni vektor uvođenjem ciljnog liganda CPLDIDFYC za integrin $\alpha_4\beta_1$ u HI petlju glave vlakna, kako bi se preusmjerio Ad5 na integrin $\alpha_4\beta_1$ (poznat i pod imenom VLA-4, engl. *very late antigen*). Rekombinantni Ad5VLA-4 virus konstruiran je manipulacijom cjelovitog Ad5 genoma kao plazmida u *E. coli*, pri čemu je korištena homologna rekombinacija u bakterijama. Ad5VLA-4 i kontrolni virus Ad5wt bez ciljnog slijeda, umnoženi su u kulturi bubrežnih stanica ljudskog embrija 293 i pročišćeni u gradijentu cezijeva klorida. Koristeći model ljudskih stanica rabdomyosarkoma, koje eksprimiraju integrin $\alpha_4\beta_1$, pokazali smo povećanu djelotvornost transdukcije s Ad5VLA-4 u usporedbi s Ad5wt. Prema tome Ad5VLA-4 bi se mogao koristiti za gensku terapiju tumora koji eksprimiraju integrin $\alpha_4\beta_1$.

(44 stranice, 16 slika, 3 tablice, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: preusmjeravanje, adenovirus, integrin $\alpha_4\beta_1$, VLA-4

Voditelj: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković

Ocjenitelji: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković;

doc. dr. sc. Dubravka Hranilović, docent, prof. dr. sc. Mladen Krajačić, redoviti profesor, doc. dr.

sc. Maja Matulić, docent; Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Rad prihvaćen: 08. travnja 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Retargeting adenovirus type 5 to integrin $\alpha_4\beta_1$

Tihana Jelušić

Laboratory for Genotoxic Agents, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković
Institute, Zagreb, Croatia

Genetic retargeting of Adenovirus type 5 (Ad5) through insertion of sequences in the fiber protein should permit targeted gene delivery. The aim of this research is to construct replication defective adenoviral vector by incorporating $\alpha_4\beta_1$ integrin-targeting ligand CPLDIDFYC into the HI-loop of the fiber protein, in order to retarget Ad5 to integrin $\alpha_4\beta_1$ (also known as very late antigen 4, VLA-4). Construction of Ad5VLA-4 was performed by manipulation of the full length Ad5 genome as a stable plasmid in *E. coli*, using the bacterial homologous recombination machinery. Ad5VLA-4 and a control virus Ad5wt lacking targeting sequence, were multiplied in human embryonic kidney cell line-293 and purified by bending in CsCl gradients. On the rhabdomyosarcoma (RD) cell line, which express $\alpha_4\beta_1$ integrin, Ad5VLA-4 exhibited increased transduction efficacy in comparison to Ad5wt. Therefore, Ad5VLA-4 could be suitable vector for gene therapy of tumors expressing $\alpha_4\beta_1$ integrin.

(44 pages, 16 figures, 3 tables, 53 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in Central biological library

Keywords: Ad retargeting, integrin $\alpha_4\beta_1$, VLA-4

Supervisor: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute

Reviewers: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute; doc. dr. Dubravka Hranilović, assistant professor, prof. dr. sc. Mladen Krajačić, full professor, doc. dr. sc. Maja Matulić, assistant professor; Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: April 8th 2009

Zahvale

Zahvaljujem svojoj majci, Nevenki, koja me naučila upornosti i predanosti radu.

Zahvaljujem ocu Tihomilu koji mi je omogućio da se bavim onime što volim.

Posebno zahvaljujem svome dečku Ivanu, koji me najviše od svih bodrio i nastojao mi u svemu pomoći, na ogromnom strpljenju i ljubavi.

Zahvaljujem prijateljici Katarini koja mi je pomogla svojim savjetima i računalnim sposobnostima.

Zahvaljujem mentorici, Dr. sc. Andreji Ambriović-Ristov, na strpljenju, stalnoj spremnosti da pomogne i nastojanju da me što više nauči.

Zahvaljujem Dr. sc. Dragomiri Majhen, koja mi je pomogla u laboratorijskom radu i bodrila svojim optimizmom.

Zahvaljujem svim djelatnicama Laboratorija za genotoksične agense Instuta Ruđer Bošković, divnim ženama koje su uvijek spremne saslušati i pomoći: Dr. sc. Maji Osmak, Dr. sc. Anamariji Brozović, Dr. sc. Tamari Čimbora-Zovko, Mr. sc. Sanjci Rak i gospođi Ljiljani Krajcar.

Zahvaljujem Prof. dr. sc. Mladenu Krajačiću i članicama povjerenstva Doc. dr. Dubravki Hranilović i Doc. dr. sc. Maji Matulić s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, čiji su me kolegiji mnogočemu naučili i tako mi pomogli u ostvarivanju ovoga rada.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Adenovirusi.....	1
1.1.1. Građa adenovirusa tipa 5	1
1.1.2. Genom adenovirusa tipa 5	2
1.1.3. Životni ciklus adenovirusa	3
1.2. Adenovirusni vektori.....	6
1.2.1. Preusmjeravanje Ad vektora	7
1.3. Otkrivanje faga	10
1.4. Integrini.....	10
1.4.1. $\alpha_4\beta_1$ integrin.....	11
2. Problematika rada.....	12
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Osnovne kemikalije.....	13
3.1.2. Enzimi.....	13
3.1.3. Stanične linije	13
3.1.4. Početnice.....	14
3.1.5. Kompleti	14
3.1.6. Ostali materijali i pomagala.....	14
3.1.7. Priprema otopina	15
3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija.....	15
3.1.9. Sojevi bakterija	16
3.1.10. Korišteni plazmidi	16
3.1.11. Uređaji.....	17
3.2. Metode	18
3.2.1. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama	18
3.2.2. Taloženje plazmidne DNA solima i etanolom.....	18
3.2.3. Obrada 3' krajeva DNA molekule T4 DNA polimerazom.....	18
3.2.4. Pročišćavanje plazmidne DNA fenol-kloroformom.....	19
3.2.5. Povezivanje odsječaka DNA.....	19
3.2.6. Elektroforeza DNA u gelu agaroze	19

3.2.7. Izdvajanje odsječaka DNA iz gela agaroze.....	19
3.2.8. Priprema kompetentnih <i>E.coli</i> BJ5183 bakterija za transformaciju temperaturnim šokom.....	20
3.2.9. Transformacija kompetentnih bakterija <i>E.coli</i> BJ5183 temperaturnim šokom.....	20
3.2.10. Transformacija kompetentnih bakterija <i>E.coli</i> DH5 α (Invitrogen, SAD) temperaturnim šokom	20
3.2.11. Izdvajanje plazmidne DNA iz bakterija	20
3.2.12. Lančana reakcija polimerazom	21
3.2.13. Transfekcija HEK-293 stanica u cilju umnažanja konstruiranog rekombinantnog adenovirusa	21
3.2.14. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa	22
3.2.15. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa	23
3.2.16. Određivanje broja infektivnih čestica	23
3.2.17. Transdukcija RD stanica adenovirusom	24
4. Rezultati	25
4.1. Konstrukcija DNA Ad5VLA-4.....	25
4.1.1. Konstrukcija transfer vektora	25
4.1.2. Homologna rekombinacija	28
4.2. Dobivanje virusnih čestica Ad5VLA-4, umnažanje i pročišćavanje.....	31
4.3. Karakterizacija Ad5VLA-4	32
4.4. Ad5VLA-4 pokazuje povećanu djelotvornost transdukcije RD stanica koje eksprimiraju $\alpha_4\beta_1$ integrin	33
5. Rasprava	34
6. Zaključci	38
7. Literatura	39
8. Životopis	44

1. Uvod

1.1. Adenovirusi

Adenoviruse je prvi put izdvojio Rowe 1953. godine iz adenoidnog tkiva u kulturi stanica (Rowe i sur., 1953). Adenovirusi pripadaju porodici *Adenoviridae*. Ova porodica obuhvaća rodove *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* i *Mastadenovirus*. Ljudski adenovirusi pripadaju rodu *Mastadenovirus* (Cann, 2005). Do danas je otkriveno 51 različitih serotipova ljudskih adenovirusa koji su podijeljeni u 6 podskupina (A-F) prema svojstvima hemaglutinacije, onkogeničnosti u modelnim organizmima (glodavcima), homologiji DNA i organizaciji genoma (Russell, 2009). Primijećena je korelacija između podskupina i tropizma adenovirusa. Virusi u podskupinama B, C i E uzrokuju infekcije dišnih puteva, neki virusi B podskupine inficiraju bubrege i mokraćne puteve, virusi podskupine F uzrokuju gastroenteritis, a neki iz podskupine D povezuju se s epidemijom keratokonjunktivitisa (Zhang i Bergelson, 2005).

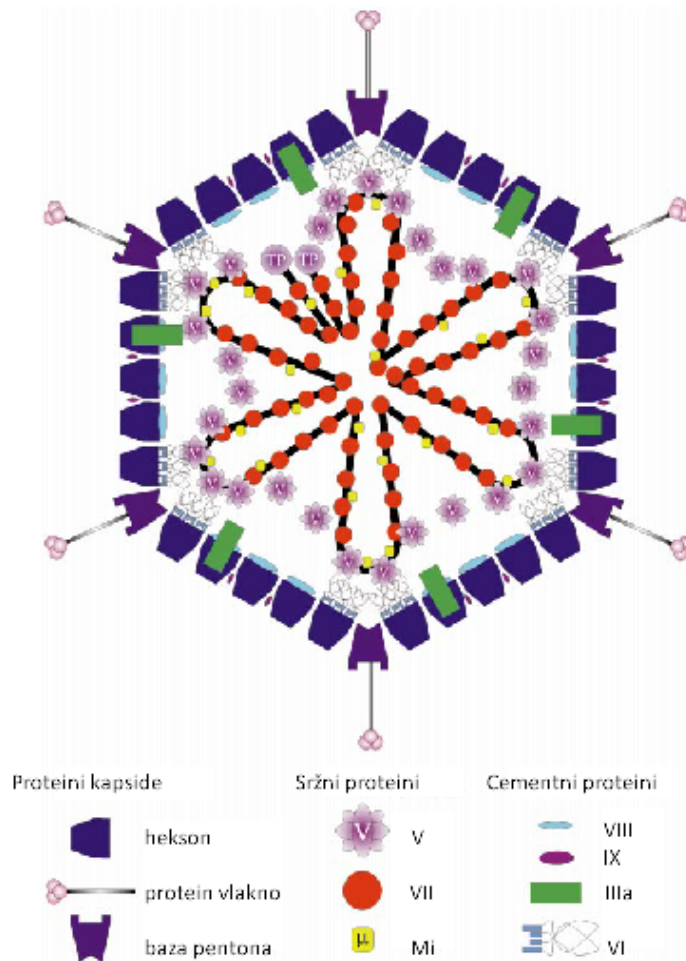
Adenovirusi su poslužili za razvoj vektora za prijenos gena. Prednosti adenovirusa očituju se u dobrom poznavanju adenovirusnog genoma, sposobnosti infekcije stanica u diobi i onih koje se ne dijele, mogućnosti proizvodnje pročišćenih virusnih čestica visokog titra te relativno velikog kapaciteta ugradnje strane DNA. Činjenica da izazivaju uglavnom blage bolesti značajno je pridonijela razvoju adenovirusnih vektora. Najčešće se koriste vektori temeljeni na tipovima 2 i 5 podskupine C (Rein i sur., 2006 ; Russell, 2009).

1.1.1. Građa adenovirusa tipa 5

Čestica ljudskog adenovirusa tipa 5 (Ad5) ima oblik ikozaedra, nema ovojnicu i sadrži oko 36 kb dvolančane DNA. Kapsida se sastoji od tri glavna kapsidna proteina: heksona (protein II), pentona (protein III) i vlakna (protein IV) . Kapsida osim toga sadrži i proteine VI, VIII, IX, IIIa i IVa2 (Russell, 2009) (slika 1.1.).

Hekson je najzastupljeniji strukturni protein koji tvori kapsomere. Svaka virusna čestica sadrži 240 kapsomera, od kojih je svaka kapsomera sastavljena od tri molekule heksona (homotrimer). Drugi po zastupljenosti protein u Ad5 kapsidi je penton koji tvori pentamere (bazu pentona), nalazi se na svakom od 12 vrhova kapside. Na bazu pentona pričvršćeno je

vlakno. Vlakno je homotrimer, a funkcionalno i strukturno je podijeljen na rep, držak i glavu. Držak je trostruka čvrsto zavijena spirala, dok je glava (globularni dio) po strukturi trokrilni propeler (Russell, 2009).



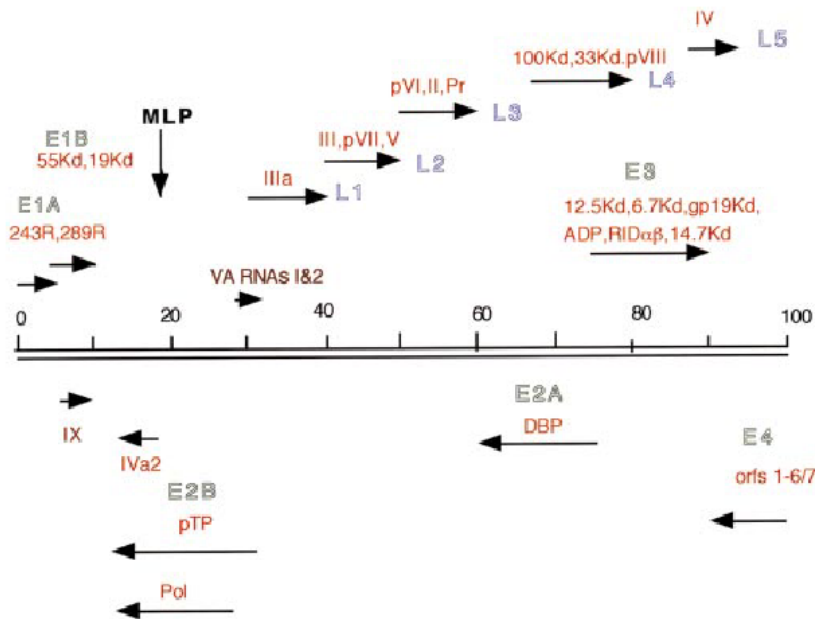
Slika 1.1. Struktura adenovirusa.

Preuzeto iz Russell, 2000.

1.1.2. Genom adenovirusa tipa 5

Genom Ad5 je linearna dvolančana DNA veličine 36 kb, s terminalnim proteinom (TP na slici 1.1.) kovalentno vezanim na 5' krajeve, koji služi kao početnica pri replikaciji. Genom na krajevima sadrži obrnuto ponavljajuće sljedove (ITR) veličine 103 bp. Virusna DNA je povezana s bazičnim proteinom VII i malim peptidom nazvanim *mi*. Protein V povezuje ovaj kompleks DNA-protein s kapsidom preko proteina VI. Virus također kodira proteazu potrebnu za procesiranje strukturnih proteina (Russell, 2009).

Genom Ad5 sadrži pet ranih, jednu kasnu i četiri intermedijarne transkripcijske jedinice koje su kodirane sa oba lanca DNA i koje se preklapaju (slika 1.2). Nakon ulaska virusne DNA u jezgru inficirane stanice eksprimiraju se rani geni i to redoslijedom E1A, E1B, E2, E3 i E4. Slijedi ekspresija intermedijarnih gena IVa2, IX, VA I i VA II, te na kraju kasnih gena (dodatno podijeljenih na L1 do L5) (Russell, 2009).



Slika 1.2. Struktura Ad5 genoma i prikaz transkripcijskih jedinica.

Preuzeto iz Russell, 2000.

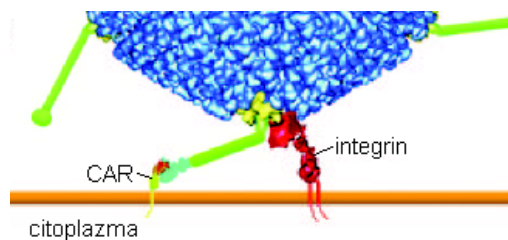
1.1.3. Životni ciklus adenovirusa

Životni ciklus Ad5 može se podijeliti na dvije faze: ranu i kasnu. Između ove dvije faze odvija se replikacija virusne DNA. Rana faza obuhvaća ulazak virusa u stanicu i prijenos virusnog genoma u jezgru. Druga faza sastoji se od transkripcije i translacije kasnih gena, sklapanja strukturnih proteina virusa u jezgri i sazrijevanja infektivnih virusnih čestica. Rana faza u stanici u kojoj je omogućena replikacija virusa traje 6 do 8 sati, dok je kasna nešto brža, od 4 do 6 sati (Russell, 2009).

Virusna čestica se veže na receptore na površini ciljane stanice. Vlakno Ad5 se veže na molekulu koja je istovremeno receptor za virus coxsackie tipa B, pa je zbog toga nazvan coxsackie/adenovirusnim receptorom (CAR) (Bergelson i sur., 1997). CAR je membranski protein od 46 kDa i pripada superporodici imunoglobulina. Sadrži izvanstaničnu, transmembransku i

citoplazmatsku domenu. Nalazi se površini stanica srčanog mišića, mozga, gušterače, crijeva, pluća, jetre i bubrega (Tomko i sur., 1997). CAR se preko svoje N-terminalne domene veže sa mjestom na vanjskoj površini glave vlakna. Poznato je da osim CAR-a, Ad5 čestica za početno vezanje na površinu stanice može koristiti i heparan sulfat glikozaminglikane (HS-GAG) te glavni kompleks tkivne snošljivosti klase I (MHC-I) (Zhang i Bergelson 2005).

Nakon vezanja na primarni receptor (CAR) slijedi interakcija RGD slijeda (Arg-Gly-Asp) iz pentona s integrinima na površini stanice. Ova interakcija dovodi do internalizacije (ulaska endocitozom) virusne čestice u stanicu. Pokazano je da u tome sudjeluju integrini $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_3\beta_1$ (Davison i sur., 1997, 2001; Huang i sur., 1996; Li i sur., 2001; Salone i sur., 2003; Wickham i sur., 1993). Da bi ova interakcija bila moguća, vlakno mora biti dovoljno dugačko i savitljivo da dođe do prostorno povoljnog položaja u kojem će se baza pentona moći vezati s integrinima na površini stanice (Slika 1.3.). Internalizacija odnosno ulazak Ad5 čestice u stanicu ostvaruje se endocitozom posredovanom klatrinom (Zhang i Bergelson., 2005).

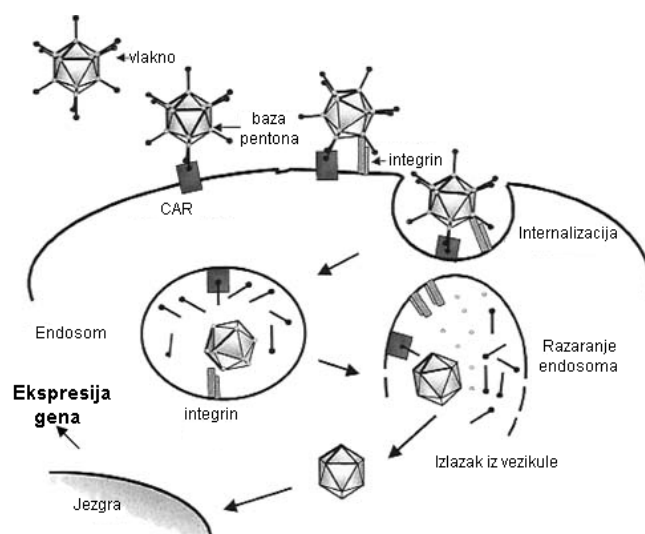


Slika 1.3. Interakcija virusne čestice s CAR i integrinom.

Preuzeto iz Zhang i Bergelson., 2005.

Interakcija Ad5 i integrina na površini stanice potiče velik broj signalnih puteva u stanici, od kojih je važno spomenuti aktivaciju fosfoinozitol-3-OH kinaznog puta (PI-3K) koji aktivira Rho obitelj GTPaza što dovodi do polimerizacije i reorganizacije aktinskih vlakana u stanici kako bi se omogućila endocitoza (Li i sur., 1998).

Nakon što se virus nađe u endosomu započinje aktivnost vakuolarne H^+ -ATPaze, što dovodi do zakiseljavanja endosoma do pH vrijednosti 5,5-6. To vodi prema strukturnim promjenama Ad5 čestice, lize membrane endosoma i izlaska kapside u citoplazmu. U oslobađanju virusa iz endosoma vrlo važnu ulogu ima integrin $\alpha_v\beta_5$ (Majhen i sur., 2009). Djelomično oslobođena virusna DNA prenosi se do jezgrine membrane i genom Ad5 ulazi u jezgru kroz jezgrine pore. Shema internalizacije adenovirusne čestice prikazana je na slici 1.4.



Slika 1.4. Internalizacija adenovirusne čestice i prijenos do jezgre.

Preuzeto iz Contreras i sur., 2005.

Nakon ulaska Ad5 DNA u jezgru ekspirira se rano područje E1 čiji produkti se mogu podijeliti na E1A i E1B. E1A proteini aktiviraju ostale rane transkripcijske jedinice, E1B, E2, E3 i E4. E1A protein veže se na stanični protein pRb, produkt tumor-supresorskog gena Rb. Vezanje E1A i pRb uzrokuje otpuštanje transkripcijskog faktora E2F iz veznog mjesta na pRb. E2F potiče transkripciju što dovodi do sinteze DNA i ulazak stanice u S fazu staničnog ciklusa. Produkt E1B gena, 19K protein analogan je produktu Bcl-2 gena, što znači da produžuje preživljavanje stanice interakcijama s proteinima porodice Bax, koji uzrokuju apoptozu i nekrozu stanice. E1B 55 K protein veže se na p53 protein čime sprječava apoptozu (Russell, 2000).

Produkti E2 gena podijeljeni su na E2A (DNA vezni protein), i E2B (pTP i Pol- preterminalni protein i DNA polimerazu) proteine koji služe za replikaciju virusne DNA i osiguravaju transkripciju kasnih gena (Russell, 2000).

E3 geni kodiraju nekoliko proteina koji virusu omogućavaju izbjegavanje odgovora stanice na infekciju (Russell, 2000).

E4 genski produkti (orf 1-6/7) uglavnom olakšavaju metabolizam virusne mRNA (ponekad u vezanju s E1B genskim produktima) (Leppard, 1997) te utječu u stanici na favoriziranje replikacije virusne DNA u odnosu na vlastitu (Russell, 2000).

Adenovirusi također prepisuju i set RNA molekula, koje se ne prevode, to su VA RNA (Virus Associated RNA) molekule koje imaju ulogu u borbi protiv obrambenih mehanizama stanice na infekciju (Mathews i Shenk, 1991).

DNA replikacija započinje s oba kraja DNA molekule i potrebni su joj ITR sljedovi koji služe kao izvorišta replikacije.

Nakon započete replikacije dolazi do prepisivanja kasnih gena (kasna transkripcijska jedinica podijeljena je na L1 do L5), čime nastaju strukturni proteini. Dolazi do sklapanja virusnih čestica i njihovog sazrijevanja u jezgri. Procesom obavijanja virusne DNA u kapsidu upravlja signal za pakiranje koji se nalazi na lijevom kraju molekule (dogovorno) i sastoji se od AT-bogatih sljedova. Ove događaje prate velike promjene u strukturi jezgre i permeabilizacija jezgrine membrane, čime se olakšava izlazak sklopljenih virusnih čestica u citoplazmu i nakon čega slijedi razaranje plazmatske membrane i oslobađanje virusnih čestica iz stanice (Russell, 2009).

1.2. Adenovirusni vektori

Adenovirusi mogu inficirati mnogo različitih tipova stanica i tkiva, te mogu inficirati stanice koje se dijele i one koje se ne dijele. Jednostavni su za rukovanje i lako se pročišćavaju u visokom titru, te su se već u 80-im godinama prošlog stoljeća počeli koristiti kao vektori za prijenos gena. Vrlo je važno da se nakon ulaska u jezgru stanice, Ad5 DNA ne ugrađuje u genom domaćina pa ne postoji opasnost od insercijske mutageneze. Zato se smatraju jednim od najsigurnijih vektorskih sustava za gensku terapiju (Russell, 2009).

U Ad5 se može ugraditi oko 2 kb strane DNA bez značajnog utjecaja na stabilnost ili infektivnost (Bett i sur., 1993). Kapacitet ugradnje se može povećati uklanjanjem (delecijom) nekih, pa čak i svih virusnih gena. Tako su postupnim uklanjanjem sve više adenovirusnih gena razvijene generacije Ad5 vektora.

U prvoj generaciji Ad5 vektora uklonjeni su E1 i/ili E3 geni, dozvoljavajući tako unos do 6,5 kb strane DNA, često pod kontrolom heterolognog promotora. Kod E1 delecija posebno se moralo paziti da se u genomu zadrže ITR sljedovi i sljedovi potrebni za pakiranje virusne čestice. Uklanjanje E1 područja onemogućuje transkripciju ostalih ranih gena (koji su transkripcijski ovisni o E1) pa tako i replikaciju virusne DNA i proizvodnju kapsidnih proteina (Russell, 2009). Za umnažanje ovakvih replikacijski defektnih Ad5 koriste se stanice koje osiguravaju produkte E1

gena *in trans* (npr. bubrežne stanice ljudskog embrija, HEK-293, engl. *human embryonic kidney*) (Graham i sur., 1977).

Iako je uklanjanje E1A područja genoma jako smanjilo ekspresiju ostalih virusnih gena nije ju u potpunosti onemogućilo. Stoga su razvijeni vektori druge generacije u kojima su se postupno uklanjala područja E2 i E4. Svaka novo uvedena delecija zahtijeva postojanje odgovarajuće komplementirajuće stanične linije. Ovakvi adenovirusni vektori imaju smanjenu toksičnost, a ekspresija gena koje unose u stanicu je produljena u odnosu na one prijašnjih generacija zbog manje izraženog imunog odgovora domaćina na virusne proteine (Russell, 2009).

Adenovirusni vektori kod kojih su uklonjeni svi virusni geni nazivaju se visokokapacitetnima ili "*gutless*" vektorima. Oni zadržavaju samo ITR sljedove i slijed za pakiranje, no za umnažanje im je potreban pomoćni virus kojeg je još uvijek vrlo teško odvojiti od čestica Ad5 vektora. Ova činjenica je glavni razlog njihove ne tako česte upotrebe (Alba i sur., 2005).

1.2.1. Preusmjeravanje Ad vektora

Razina ekspresije CAR je ograničavajući čimbenik u korištenju Ad5 kao vektora. Ekspresija CAR je vrlo varijabilna na različitim tipovima stanica, a često je niska na stanicama tumora, što onemogućuje učinkovitu Ad5 transdukciju (izraz koji se češće koristi za infekciju replikacijski defektnim adenovirusima), odnosno onemogućava odgovarajući unos gena u stanicu u terapijske svrhe. Da bi se zaobišao ovaj problem osmišljeni su načini preusmjeravanja virusa kojima se transdukcija preusmjerava na molekulu koja je specifično i/ili snažno eksprimirana na ciljnoj stanici. Dvije su glavne strategije ciljanja Ad5 vektorima, a to su transdukcijско ciljanje, koje usmjerava transdukciju na određeni tip stanica, te transkripcijsko ciljanje koje omogućuje transkripciju samo u željenom tipu stanica (Glasgow i sur., 2006).

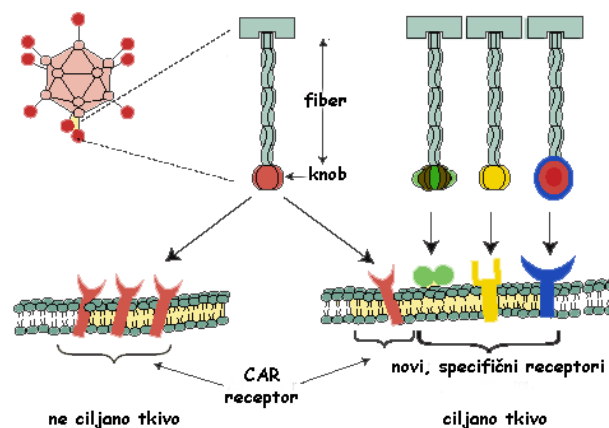
Transdukcijско ciljanje

U transdukcijskom ciljanju želi se adenovirusnoj čestici dodati specifičnost vezanja na novu, ciljnu molekulu, ali često i dokinuti nativni tropizam (vezanje na CAR). Dva su pristupa u transdukcijskom ciljanju: ciljanje molekulama adapterima i gensko ciljanje.

Molekule adapteri su bispecifične molekule koje povezuju Ad5 vektor s ciljnim receptorom na površini stanice. Time se dokida nativni tropizam Ad5 i istovremeno preusmjerava vezanje Ad5 na novi receptor. Bispecifične adapterske molekule mogu npr. biti bispecifična protutijela, kemijski konjugati fragmenata protutijela (Fab) i nekog liganda za vezanje na stanicu (npr. folat), konjugati Fab-antitijelo koji koriste protutijela za ciljne stanične receptore, konjugati Fab-peptidni ligand, te rekombinantni fuzijski proteini Fab fragmenta i peptidnog liganda (Glasgow i sur., 2006).

Gensko ciljanje se ostvaruje genskom manipulacijom vlakna (slika 1.5.) ili kapsidnih proteina. Zbog velikog broja kapsidnih proteina u odnosu na broj molekula vlakna moguće je ugraditi velik broj liganada po virionu. Do sada je objavljena uspješna ugradnja heterolognih peptida u hekson, te manji kapsidni proteini pIX i pIII (Glasgow i sur., 2006). Ipak danas se najviše istražuju Ad5 vektori genski preusmjereni modifikacijom vlakna. Tri su osnovne strategije za promjenu tropizma strukturnom promjenom vlakna Ad5:

- 1) pseudotipiziranje vlakna
- 2) ugradnja liganada u glavu vlakna
- 3) "de-knobbing" odnosno uklanjanje glave sa vlakna povezanog s ligandom

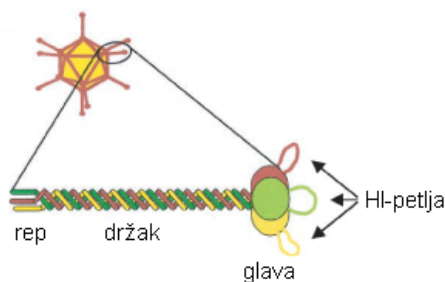


Slika 1.5. Preusmjeravanje adenovirusa modifikacijom protein-vlakna.

Preuzeto iz Baker, 2002.

1) *Pseudotipiziranje vlakna* je genska zamjena cijelog vlakna ili samo domene glave sa strukturnim analogom iz ljudskog (ali može i životinjskog) adenovirusa nekog drugog serotipa, a koji prepoznaje neki drugi stanični receptor koji nije CAR. Ovako nastaju tzv. kimerni vektori, a najčešća kombinacija je zamjena Ad5 glave s glavom iz Ad3 (Belousova i sur., 2002).

2) *Direktna ugradnja liganda u glavu Ad5 vlakna* može biti sa ili bez dokidanja vezanja za CAR, ovisno o modelu. Naime za *in vitro* eksperimente u kojima se kao model koriste stanice koje imaju vrlo malo ili nemaju CAR nije nužno dokinuti vezno mjesto u vlaknu. Međutim za *in vivo* eksperimente to je neophodno potrebno kako bi se spriječila infekcija stanica koje ekspimiraju CAR. Najčešće mjesto ugradnje liganda u vlakno je HI-petlja (Krasnykh i sur., 1998) (slika 1.6.). Ova petlja povezuje β -ploče H i I unutar Ad5 glave vlakna, okrenuta je prema vanjskoj strani trimera vlakna tj. dostupna je potencijalnom receptoru i dopušta ugradnju do 100 aminokiselina bez negativnog učinka na stabilnost i infektivnost virusne čestice (Belousova i sur., 2002). U HI-petlju je uspješno unesen već spomenuti RGD motiv koji ima sposobnost vezanja integrina (Dmitriev i sur., 1998), NGR motiv koji se veže na aminopeptidazu N (Majhen i sur., 2006) i SIGYPLP koji se veže na receptore stanica ljudskog krvožilnog endotela (Nicklin i sur., 2001).



Slika 1.6. HI-petlja protein-vlakna.
Preuzeto iz Krasnykh i sur., 2000.

3) "*de-knobbing*" odnosno *uklanjanje glave vlakna* dokida vezanje na CAR. Ciljanje se postiže ugradnjom liganda umjesto glave. Jedina zapreka u ovom pristupu je potreba za dodatkom trimerizacijskog signala bez kojega ne može doći do ugradnje u virusnu česticu (Glasgow i sur., 2006).

Transkripcijsko ciljanje

Transkripcijsko ciljanje ograničava ekspresiju unesenog gena u ciljnu stanicu upotrebom specifičnih promotora. Kako se Ad5 vektori koriste najčešće za gensku terapiju tumora, često se koriste tumor specifični promotori kao npr. promotor karcinoembrionalnog antigena (CEA) koji je aktivan je u većini tumora pluća, gušterače i želuca (Glasgow i sur., 2004).

1.3. Otkrivanje faga

Za identifikaciju liganada koji se mogu vezati na određenu molekulu koristi se metoda otkrivanja faga. Jedan od najboljih primjera ovako prepoznatih peptida je RGD slijed (Arg-Gly-Asp), koji se veže na α_v integrine na površini stanice.

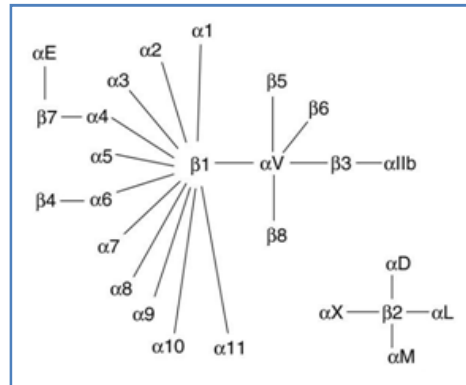
U ovoj metodi odabiru se fagi koji eksprimiraju ligande sa sposobnošću vezanja na neku ciljnu molekulu ili tip stanice. Biblioteka faga s ugrađenim nasumičnim ligandima u 10^9 mogućih permutacija stavlja se u kontakt s nekom molekulom ili stanicama (*in vitro* otkrivanje faga) ili se injicira direktno u venu eksperimentalne životinje (*in vivo* otkrivanje faga). U oba slučaja se nakon vezanja na potencijalni receptor nevezane molekule uklanjaju, a specifično vezani fagi se eluiraju i umnažaju u bakterijama. Nakon nekoliko ciklusa odabrani fagi se izdvajaju i određuje se slijed nukleotida liganada, čime se otkrivaju aminokiselinski sljedovi (Koivunen i sur., 1999).

1.4. Integrini

Integrini su adhezijske molekule na površini stanice koje se vežu na proteine izvanstaničnog matriksa, ali i na proteine na drugim stanicama. Vezanjem potiču niz signala koji reguliraju mnoge procese u stanici kao što su rast, dioba, diferencijacija, pokretljivost i preživljenje. Integrini također prepoznaju i neke otopljene proteine plazme, neke viruse (tu ubrajamo i adenoviruse) i bakterije. Integrini su heterodimeri sastavljeni od dvije podjedinice: α (alpha) i β (beta). Molekularna masa podjedinica može varirati od 90 kDa do 160 kDa (Hynes, 2002). Do sada je otkriveno ukupno 18 α i 8 β podjedinica što daje 24 kombinacije integrinskih heterodimera (Melker i Sonnenberg, 1999) (slika 1.7.).

Amino kraj svakog lanca tvori globularnu glavu koja doprinosi međulančanom povezivanju i vezanju liganada. Globularne glave sadrže i domene koje vežu dvovalentne katione, a nužne su za receptorsku funkciju integrina (Hynes, 2002).

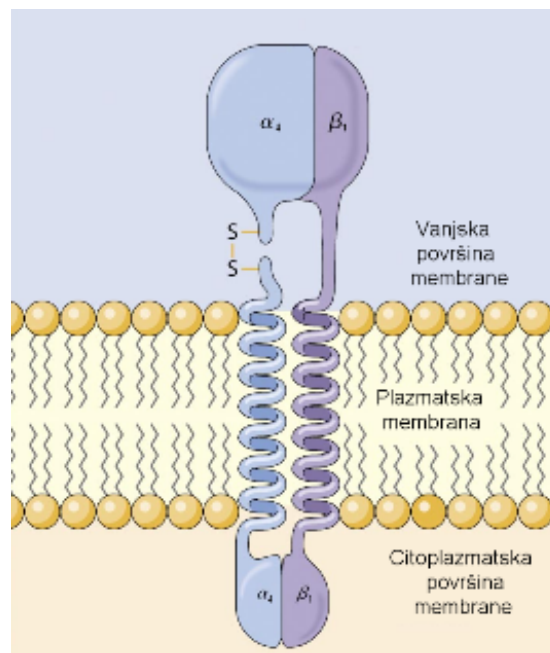
Integrini su klasificirani u nekoliko potporodica prema β -lancima u heterodimerima. Integrini koji sadrže β_1 lance još se nazivaju i VLA integrinima (od engl. *Very Late Antigens*).



Slika 1.7. Shema mogućih kombinacija ljudskih integrina. Preuzeto iz Takada i sur., 2007.

1.4.1. $\alpha_4\beta_1$ integrin

Integrin $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) je eksprimiran na površini monocita, limfocita, eozinofila, bazofila i makrofaga, ali nije nađen na neutrofilima. Građen je od dviju podjedinica, alfa podjedinice CD49d i beta podjedinice CD29 (slika 1.8.). Primarni ligandi za $\alpha_4\beta_1$ integrin su krvožilni adhezini (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule*, VCAM) i fibronektin. U imunom sustavu $\alpha_4\beta_1$ integrin ima važnu ulogu u prometu obrambenih stanica tijekom upalnih procesa. VLA-4 posreduje međustanične interakcije limfocita i aktiviranih stanica endotela krvnih žila što prethodi ekstravazaciji imunskih stanica u upalom pogođenim područjima (González-Amaro i sur., 2005).



Slika 1.8. Struktura integrina VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$). Preuzeto iz Pearson Education, 2009.

2. Problematika rada

Genska terapija je postupak prijenosa genskog materijala u stanicu s ciljem postizanja terapijskog učinka, bilo korekcijom prisutnog poremećaja ili unosom u stanicu neke nove funkcije. Vektori temeljeni na adenovirusu tip 5 (Ad5) najčešće se upotrebljavaju u genskoj terapiji tumora. Uspješnost prijenosa gena Ad5 ovisi o djelotvornoj transdukciji ciljnih stanica. Slaba ili čak odsutna ekspresija primarnog adenovirusnog receptora CAR (engl. *coxsackie adenovirus receptor*) prepreka je uspješnoj transdukciji nekih tipova tumora. Jedan od načina za povećanje prijenosa gena Ad5 vektorima je preusmjerenje na receptore povećano eksprimirane na nekom tipu tumora. Jedan od takvih receptora je integrin $\alpha_4\beta_1$ za koji je pokazano da se pojačano eksprimira na stanicama akutne mijeloične leukemije.

Cilj ovog rada je konstruirati Ad5 preusmjeren na integrin $\alpha_4\beta_1$ koristeći aminokiselinski slijed CPLDIDFYC koji je pronađen metodom otkrivanja faga (Jäger i sur., 2007) i na modelu stanica rabdomiosarkoma, koje ekspimiraju iznimno malu količinu CAR ali povećanu količinu integrina $\alpha_4\beta_1$, pokazati uspješnost ovakvog preusmjerenja.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

U radu su korišteni agaroz (Serva, Njemačka), glicerol (Kemika, Hrvatska), tripton (Difco Laboratories, SAD), ekstrakt kvasca (Difco Laboratories, SAD) SDS (Na-dodecil sulfat) (Serva, Njemačka), Tris baza (Sigma, Njemačka), Tris-HCl (Serva, Njemačka), EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina) (Kemika, Hrvatska), DMSO (dimetil-sulfoksid) (Kemika, Hrvatska), etidij-bromid (Serva, Njemačka), MgCl₂ (Kemika, Hrvatska), CaCl₂ (Kemika, Hrvatska), NaCl (Kemika, Hrvatska), CsCl (Sigma, Njemačka), tripsin (Invitrogen, SAD), 25 mM dNTP (deoksiribonukleotid-trifosfati) (Amersham Biosciences, Švedska), etanol (Kemika, Hrvatska), fenol/kloroform/izoamilni alkohol (v/v/v 25:24:1), K-ferocijanid (Sigma, Njemačka), K-fericijanid (Sigma, Njemačka), glutaraldehid 25% (Sigma, Njemačka), x-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid) (Sigma, Njemačka), ampicilin (Serva, Njemačka), deionizirana voda (diH₂O), standard dužine odsječaka DNA 1 kb (Invitrogen, SAD), Opti MEM (Invitrogen, SAD), tekuća hranjiva podloga pogodna za rast kulture stanica DMEM (engl., *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (Invitrogen, SAD), serum fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Invitrogen, SAD) i Orange G (Merck, Njemačka).

3.1.2. Enzimi

Restriksijske endonukleaze sa pripadajućim puferima (Roche, Njemačka; New England Biolabs, UK), Ready-To-Go™ T4 DNA ligaza (Amersham Biosciences, Švedska), T4 DNA polimeraza (Roche, Njemačka) i Taq DNA-polimeraza (Invitrogen, SAD) .

3.1.3. Stanične linije

U ovom radu su korištene bubrežne stanice ljudskog embrija (HEK-293; engl. *human embryonic kidney*, ATCC CRC-1573) te stanice rabdomiosarkoma ljudskog embrija (RD; engl. *rhabdomyosarcoma*, ATCC CCL-136).

Stanične linije uzgajane su u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge) (Invitrogen, SAD) uz dodatak 26,2 mM NaHCO₃ i 0,01% w/v streptomycin/kristacilina, pH 7 i 10% seruma fetusa

goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Invitrogen, SAD). Kratica za ovu podlogu je DMEM-FBS. Stanice su uzgajane u vlažnoj atmosferi pri 37°C uz 5% CO₂.

3.1.4. Početnice

U lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) korištene su početnice: pHloopU: 5'-GTAACATTGTCAGTCAAGTTTAC-3' i pHloopD: 5'-GATGTGGCAAATATTTTCAT TAATG-3'.

3.1.5. Kompleti

Za izdvajanje i pročišćavanje odsječaka DNA iz gela agaroze korišten je komplet "QIAquick Gel Extraction Kit" (Quiagen, Njemačka).

Za izdvajanje i pročišćavanje plazmidne DNA korišten je komplet "QIAprep Spin Mini Prep Kit" (Qiagen, Njemačka). Komplet sadrži sve potrebne komponente za izdvajanje plazmidne DNA alkalnom lizom, te kolone i pufere za pročišćavanje plazmidne DNA metodom ionske izmjene.

Za transfekciju korišten je komplet za lipofekciju Lipofectamine (Invitrogene, SAD).

3.1.6. Ostali materijali i pomagala

Petrijeve zdjelice za uzgoj kultura stanica promjera 100 mm (Falcon Becton Dickinson, SAD), pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića (Falcon Becton Dickinson, SAD), ampule za smrzavanje stanica (Falcon Becton Dickinson, SAD), staklene epruvete za uzgoj bakterija, staklene pipete (Superior, Njemačka), mikropipete (Eppendorf, Njemačka), nastavci za mikropipete (Eppendorf, Njemačka), mikroepuvete (Eppendorf, Njemačka), plastične epruvete volumena 15 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD), plastične epruvete volumena 50 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD), propipeta, filtar veličina pora 0,22 µm, spremnik ispunjen tekućim dušikom.

Pri snimanju gelova agaroze nakon elektroforeze korišten je Polaroid film tip 667 (Aldrich, Njemačka).

Za dijalizu virusa nakon pročišćavanja u gradijentu CsCl korištena su celulozna crijeva za dijalizu širine 16 mm (Serva, Njemačka).

3.1.7. Priprema otopina

TAE: 40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA (pH 8,3).

PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 1,4 mM KH₂PO.

TD: 8g NaCl i 0,38g KCl otopi se u 150 mL diH₂O, doda se 0,1g Na₂HPO₄ i 3g Tris baze, nadopuni se do 500 mL s diH₂O, podesi se pH 7,4-7,5, nadopuni do 1L sa diH₂O; sterilizira se autoklaviranjem.

Pufer za mjerenje koncentracije virusa: PBS + 0,1 % SDS (natrijev dodecil-sulfat).

Pufer za dijalizu adenovirusa: 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 10% glicerol.

X-gal-S (supstrat za bojenje na β-galaktozidaznu aktivnost): K-ferocijanid konačne koncentracije 4 mM, K-ferocijanid konačne koncentracije 4 mM, X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-gal) konačne koncentracije 3,2 mg/mL, MgCl₂ konačne koncentracije 1 mM, u PBS-u. Za bojenje na ekspresiju β-galaktozidaze priprema se svježa otopina prije upotrebe; za 1 mL otopine potrebno je: 950 μL PBS, 20 μL 200 mM K-ferocijanid, 20 μL 400 mM K-ferocijanid, 8 μL X-gal (stock 40 mg/mL u DMF-u), 2 μL 1 M MgCl₂.

Pufer za nanošenje uzoraka DNA u gel agaroze (6x): 50% glicerol, 20 mM EDTA, 0,25% Orange G boja.

Ampicilin (matična otopina): 100 mg ampicilina odvaže se u sterilnu mikroeprijetu i otopi u 1 mL sterilne diH₂O. Čuva se pri -20°C u manjim alikvotima kako bi se izbjeglo višestruko odmrzavanje i zamrzavanje.

3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj bakterije *E. coli* korištena je LB tekuća (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl) ili kruta podloga (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 15 g/L agara). U podloge za odabir po potrebi je dodavan ampicilin neposredno prije upotrebe (tekuća podloga) ili izlivanja (kruta podloga) tako da mu konačna koncentracija bude 100 μg/mL.

3.1.9. Sojevi bakterija

Za transformaciju ligacijskom smjesom korištene su komercijalno dostupne kompetentne bakterije soja *E. coli* Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (Invitrogen, SAD).

Soj *E. coli* BJ 5183 (recBC sbcBC) dobiven je ljubaznošću Dr. Mehtali M. (Strasbourg, Francuska) (Chartier i sur., 1996) i korišten je za homolognu rekombinaciju.

3.1.10. Korišteni plazmidi

pQE.16knobΔHI bio je temelj za nastanak korištenog plazmida pVLA-4. Dobiven je ljubaznošću Victora Krasnykha (University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama). Sadrži dio gena Ad5 vlakna u čijoj je HI-petlji konstruirano jedinstveno *EcoRV* restrikcijsko mjesto. Pri tome je učinjena delecija 59 parova baza iz HI-petlje vlakna. pVLA-4 derivat je plazmida pQE.16knobΔHI s insertom koji kodira aminokiselinski slijed CPLDIDFYC ugrađenim u HI-petlju vlakna (Majhen i Ambriović-Ristov, neobjavljeni rezultat). Ovaj plazmid dobiven je kloniranjem hibridiziranih oligonukleotida u jedinstveno *EcoRV* restrikcijsko mjesto pQE.16knobΔHI. Pri tome su oligonukleotidi sadržavali sve prethodno deletirane parove baza koji nedostaju u pQE.16knobΔHI, rekonstituirajući na taj način cjelovitu HI-petlju, te nukleotide koji kodiraju aminokiselinski slijed CPLDIDFYC.

pBluescriptFbΔ639 konstruiran je na temelju plazmida pBlueScript, a sadrži slijed Ad5 genoma od nt 23521 do nt 32452 koje uključuje i gen za vlakno s delecijom od 639 pb u području drška (Ambriović-Ristov i sur., 2003).

pTG3652RSVβ-gal sadrži cijeli genom replikacijski defektnog Ad5 kojem nedostaju E1A i E3 geni. Dobiven je od pTG3652 (Chartier i sur., 1996) ugradnjom gena dojavljivača za β-galaktozidazu pod kontrolom promotora virusa Rousovog sarkoma (RSV; engl. *Rous Sarcoma Virus*) u područje deletiranog E1 područja.

Karakteristike svih korištenih plazmida detaljnije su opisane u Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Korišteni plazmidi i njihove karakteristike

Plazmid	Plazmidna osnova	Veličina (pb)	Gen za otpornost na	Prisutan slijed adenovirusa	Važna svojstva
pVLA-4	pQE30	4814	Ampicilin	Područje glave vlakna Ad5 s ugrađenim slijedom koji kodira aminokiseline CPLDIDFYC u području HI-petlje	<i>Bam</i> HI, <i>Sall</i> i <i>Xba</i> I restrikcijska mjesta na krajevima dijela gena za vlakno
pBluescriptFbΔ639	pBlueScript (Stratagene, SAD)	11264	Ampicilin	Područje genoma Ad5 od nt 23521 do nt 32452 koje uključuje i gen za vlakno s delecijom od 639 pb	<i>Pvu</i> II jedinstveno restrikcijsko mjesto iz pBlueScript osnove za linearizaciju prije homologne rekombinacije
pTG3652RSVβ-gal	pPolyII	35455	Ampicilin	Cijeli genom Ad5 bez E1A i E3 gena	Delecija E1 i E3 gena, RSV-β-gal –poly A ekspresijska kazeta; jedinstveno <i>Spe</i> I restrikcijsko mjesto

3.1.11. Uređaji

Svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka), centrifuga za mikropruvete koja postiže do 14000 x g (Eppendorf, Njemačka), centrifuga za volumene do 50 mL koja postiže do 14000 x g (Heraeus, Njemačka), ultracentrifuga s rotorom SW41T (Beckman, SAD), uređaj za elektroforezu u gelu agaroze (kalup za izlijevanje gela, češalj, kadica za elektroforezu) (Hoefer Scientific Instruments,

SAD), izvor napona stuje (Amersham Biosciences, Švedska), kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Klimaoprema, Hrvatska), vibracijska miješalica (Tehnika, Slovenija), magnetska miješalica (Tehtnica, Slovenija), inkubator za uzgoj stanica (Heraeus, Njemačka), inkubator za uzgoj bakterija (Shel Lab, SAD), automatski brojač stanica Coulter Counter (Beckman Coulter, UK), termoblok (Eppendorf, Njemačka), spektrofotometar, vodena kupelj (Tehnika, Slovenija), uređaj za lančanu reakciju polimerazom (Applied Biosystems, SAD).

3.2. Metode

Korištene su standardne metode molekularne biologije detaljno opisane u priručniku "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriović-Ristov i sur., 2007).

3.2.1. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju točno određene sljedove u dvolančanoj molekuli DNA i cijepaju oba lanca dajući 5'- ili 3'-jednolančane ili tupe krajeve. Reakcije su izvođene u volumenima od 15 do 100 μL , u odgovarajućim puferima i uvjetima optimalnim za pojedini enzim prema uputama proizvođača.

3.2.2. Taloženje plazmidne DNA solima i etanolom

U svrhu promjene pufera ili povećanja koncentracije plazmidne DNA ona se može taložiti natrijevim kloridom i etanolom. U otopinu sa plazmidnom DNA dodaje se NaCl do konačne koncentracije 300 mM, te se dodaje dvostruki volumen 96% etanola ohlađenog pri -20°C . Nakon inkubacije 20 minuta pri -20°C mikroeprovete su centrifugirane 20 minuta pri 12 000 x g. Supernatant se odlije, a centrifugiranjem dodatnih nekoliko sekundi skuplja se na dno mikroeprovete preostala tekućina sa stjenki koja se zatim uklanja pipetom. Talozi plazmidne DNA su sušeni 15 minuta pri sobnoj temperaturi, a zatim otopljeni u diH_2O .

3.2.3. Obrada 3' krajeva DNA molekule T4 DNA polimerazom

T4 DNA polimeraza ima $5' \rightarrow 3'$ polimeraznu aktivnost i $3' \rightarrow 5'$ egzonukleaznu aktivnost, te se zato koristi za izravnavanje 3' i 5' jednolančanih krajeva. Istaložena DNA otapa se u 11 μL H_2O , dodaje se 4 μL 5x pufera za T4 DNA polimerazu, 4 μL 2 mM dNTP (koncentracija dobivena

razrjeđivanjem 1 μL 100 mM dNTP u 49 μL dH_2O) i 1 μL T4 DNA polimeraze (1U/ μL). Reakcija se izvodi 5 minuta pri 37°C nakon čega se zaustavlja dodatkom 1 μL 0,5 M EDTA.

3.2.4. Pročišćavanje plazmidne DNA fenol-kloroformom

Plazmidnu DNA valjalo je pročistiti od zaostataka proteina koji bi mogli smetati u daljnjim postupcima te je u tu svrhu korištena komercijalno dostupna otopina fenol-kloroform-izoamilni alkohol. Za ekstrakciju dodaje se jednaki volumen otopine fenol-kloroform-izoamilni alkohol, te nakon ekstrakcije višestrukim okretanjem mikroeprovete, centrifugira se 3 minute pri 12 000 x g. Plazmid se nalazi u gornjoj vodenoj fazi koja se pažljivo odvoji. Slijedi taloženje plazmidne DNA sa NaCl i etanolom.

3.2.5. Povezivanje odsječaka DNA

Za povezivanje odsječaka DNA koji sadrže komplementarne jednolančane ili tupe krajeve korištena je Ready-To-Go™ T4 DNA ligaza (Amersham Biosciences, Švedska). Ovaj enzim katalizira nastanak fosfodieterske veze između 3'-OH skupine jednog kraja DNA i 5'-fosfatne skupine drugog kraja DNA koji se povezuju, uz utrošak ATP-a.

3.2.6. Elektroforeza DNA u gelu agaroze

Elektroforeza DNA u gelu agaroze je metoda koja omogućuje razdvajanje molekula DNA po veličini, odnosno po njihovoj molekularnoj masi. Na pokretljivost molekula DNA u gelu utječu njihova konformacija, jačina električnog polja i sastav pufera za elektroforezu. Elektroforezom u gelu agaroze razdvajaju se molekule DNA veličine od stotinjak do preko 20 000 pb. U ovom radu su korišteni gelovi s 0,8-1,2% agaroze, ovisno o veličini odsječaka koji su se željeli razdvojiti. Molekule DNA su učinjene vidljivima dodavanjem etidij-bromida (konačne koncentracije 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Etidij-bromid je interkalirajući spoj, koji nakon interkalacije u molekulu DNA i izlaganja ultraljubičastom svjetlu (312 nm) fluorescira. Gelovi su fotografirani pomoću Polaroid kamere.

3.2.7. Izdvajanje odsječaka DNA iz gela agaroze

Nakon elektroforeze DNA u gelu agaroze, željeni odsječci za kloniranje izrezivani su skalpelom iz gela i pročišćavani pomoću kompleta "QIAquick Gel Extraction Kit" prema uputama proizvođača.

3.2.8. Priprema kompetentnih *E.coli* BJ5183 bakterija za transformaciju temperaturnim šokom

Bakterije *E. Coli* BJ5183 dobivene su zajedno sa uputama za pripremu kompetentnih bakterija, ljubaznošću Dr. Mehtali M. (Strasbourg, Francuska). Bakterije *E. coli* BJ5183 iz glicerola su nasađivane na ploče bez ampicilina i sutradan je jedna kolonija nasađena u 5 mL LB tekuće hranjive podloge i inkubirana u tresilici pri 37°C preko noći. S 1 mL noćne kulture inokulirano je 60 mL svježje LB tekuće hranjive podloge. Bakterije su prikupljane u eksponencijalnoj fazi rasta (kada je apsorbancija pri 550 nm iznosila 0,3 do 0,5) te su zatim ostavljene u ledu 10 minuta. Potom su centrifugirane 5 minuta pri 5000 x g, a dobiveni talog nježno je resuspendiran u ½ početnog volumena uzgoja 50 mM CaCl₂ i ostavljen u ledu 30 minuta. Bakterije su taložene centrifugiranjem 5 minuta pri 5000 x g i resuspendirane u 1/50 početnog volumena uzgoja 50 mM CaCl₂ i stavljene u led. Već dva sata nakon ovakve pripreme bakterije se mogu koristiti u transformaciji, a pogodne su za transformaciju (uz uvjet da se čuvaju u ledu) do dvadesetog sata nakon obrade s CaCl₂.

3.2.9. Transformacija kompetentnih bakterija *E.coli* BJ5183 temperaturnim šokom

Plazmidi u molarnom omjeru vektor (100 ng) : insert (1:12) razrjeđivani su u 0,1 M Tris HCl pH 7,4 do volumena od 100 µL. Ovako pripremljenim plazmidima dodano je 200 µL kompetentnih bakterija BJ5183, nakon čega su stavljene u led 30 minuta te podvrgnute temperaturnom šoku 2 minute pri 45°C. Bakterije su zatim inkubirane još 10 minuta u ledu te nasađivane direktno na čvrstu LB hranjivu podlogu s ampicilinom (100 µg/mL).

3.2.10. Transformacija kompetentnih bakterija *E.coli* DH5α (Invitrogen, SAD) temperaturnim šokom

U 50 µL kompetentnih bakterija *E.coli* DH5α (Invitrogen, SAD) dodavana je odgovarajuća količina plazmida (oko 1 ng) ili ligacijske smjese (2 µL) u volumenima od 1 do 5 µL. Daljnji postupak je izvođen prema uputama proizvođača. Nakon transformacije bakterije su nasađivane na čvrstu LB hranjivu podlogu s ampicilinom (100 µg/mL).

3.2.11. Izdvajanje plazmidne DNA iz bakterija

Prilikom izdvajanja i pročišćavanja plazmidne DNA iz bakterija korišten je komplet "QIAprep Spin Mini Prep Kit". Postupak je izvođen prema uputama proizvođača.

3.2.12. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) je metode umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*.

Metoda PCR na bakterijskim kolonijama temeljena je na umnažanju PCR reakcijom direktno iz bakterijske kolonije uzgojene na čvrstoj LB hranjivoj podlozi. Ova metoda omogućuje brzo pretraživanje naraslih bakterijskih kolonija kako bi se pronašle one koje sadrže plazmide s ugrađenim željenim odsječkom. Kolonije narasle na pločama s ampicilinom pokupljene su sa podloge te je svaka kolonija pojedinačno prebačena u epruvetu s po 5 mL tekuće LB podloge s ampicilinom. Epruvete s bakterijskim kolonijama su inkubirane na tresilici preko noći pri 37°C. Na talog bakterija istaloženih iz 150 µL bakterijske kulture centrifugiranjem tijekom 3 minute pri 5000 x g, dodano je 20 µL diH₂O i mikroeprovete s uzorcima inkubirane su u uređaju za PCR 10 minuta pri 95°C. U reakciji PCR korišteno je po 1,5 µL ovako pripremljenog kalupa. Za to vrijeme pripremljena je osnovna smjesa reakcije PCR (engl. *master mix* = reakcijska smjesa PCR koja sadrži sve komponente osim DNA kalupa) koja je u konačnici (nakon miješanja s kalupom) sadržavala slijedeće koncentracije pojedinih komponenti: 1x komercijalno dostupan pufer za PCR, 3 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1U Taq polimeraze po 1 µL, 0,5 pM svake pHIloopU i pHIloopD početnice. Reakcija PCR izvođena je u ukupnom volumenu od 25 µL (1,5 µL kalupa + 23,5 µL osnovne smjese). PCR reakcija započela je početnom denaturacijom 2 minute pri 95°C, nakon čega je uslijedilo 30 ciklusa denaturacije pri 95°C u trajanju 30 sekundi, sparivanja početnica pri 53°C u trajanju 30 sekundi i produljivanja lanca DNA pri 72°C u trajanju 30 sekundi. Završno produljivanje lanca DNA trajalo je 7 minuta pri 72°C. Nakon završenog umnažanja produkti su provjeravani elektroforezom u gelu agaroze.

3.2.13. Transfekcija HEK-293 stanica u cilju umnažanja konstruiranog rekombinantnog adenovirusa

Kultura bubrežnih stanica ljudskog embrija HEK-293 (engl. *human embryonic kidney*) uzgajana je u Petrijevim zdjelicama promjera 3,5 cm do potpunosti približno 80% površine na kojoj raste. Plazmid koji sadrži cijeli adenovirusni genom ugrađen u plazmidnu osnovu pPolyII prije transfekcije lineariziran je *PacI* restrikcijskim enzimom. Transfekcija HEK-293 stanica provedena je pomoću reagensa LipofectamineTM prema uputama proizvođača. Napravljene su

dvije radne otopine; otopina A i otopina B. Otopina A sadržavala je 70 µL hranjive podloge OptiMEM® u koji je dodano 2 µg plazmidne DNA. Otopina B pripremljena je od 88 µL OptiMEM® i 12 µL reagensa Lipofectamine™. Nakon pripreme, otopine A i B su pomiješane i ostavljene da stoje 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Stanice HEK-293 isprane su hranjivom podlogom DMEM. Smjesi otopina A i B dodano je 0,8 mL DMEM te je dobivena smjesa stavljana na stanice u Petrijevoj zdjelici. Nakon inkubacije tijekom 3 sata i 15 minuta pri 37°C, zamijenjena je hranjiva podloga nad stanicama s 2,5 mL svježeg DMEM-FBS. Ovako transficirane stanice ostavljene su 10 dana u inkubatoru pri 37°C i 5% CO₂.

Deset dana nakon inkubacije transficiranih stanica, sadržaj Petrijeve zdjelice skupljen je, zamrznut pri temperaturi od -20°C i odmrznut pri 37°C kroz 3 ciklusa, kako bi se oslobodile virusne čestice iz stanica. Dobiveni lizat stanica centrifugiran je 8 minuta pri 3000 x g i odvojen je supernatant od ostataka stanica u talogu. Na Petrijevu zdjelicu s HEK-293 stanicama promjera 3,5 cm dodano je po 500 µL supernatanta i inkubirano 1 sat pri 37°C. Nakon toga u Petrijeve zdjelice dodano je po 1500 mL svježeg DMEM-FBS, te su ostavljene 5 dana u inkubatoru. Ovaj postupak naziva se prvom pasažom virusa. Druga i sve ostale pasaže se izvode na jednak način do trenutka kada se citopatogeni učinak primijeti 2 do 4 dana nakon kontakta sa lizatom prethodne pasaže. Od te pasaže može se umnažati virus koristeći manje volumene lizata za infekciju.

3.2.14. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusa

Adenovirusi su pročišćavani iz 40 Petrijevih zdjelica promjera 10 cm inficiranih takovim multiplicitetom infekcije (engl. *multiplicity of infection*, m.o.i.) kojim se postiže citopatogeni učinak nakon 48 do 72 sata nakon infekcije. Iskustveno (Ambriović Ristov, osobno priopćenje) takav m.o.i. se postiže infekcijom sa 20 do 100 µL lizata pasaže u kojoj je potpuni citopatogeni učinak postignut nakon 48 do 96 sati. Stanice iz 40 Petrijevih zdjelica su sakupljane zajedno sa hranjivom podlogom i od nje odvojene centrifugiranjem (10 minuta pri 1200 x g). Dobiveni talog stanica odmrzavan je i ponovno zamrzavan tri puta kako bi se virusi oslobodili iz stanica. Nakon ovog koraka ostaci raspadnutih stanica uklonjeni su ponovnim centrifugiranjem (10 minuta pri 3000 x g).

Dobiveni lizat nanesen je na jastučić CsCl koji se dobiva nadslojavanjem 3 mL CsCl gustoće 1,4 sa 3 mL CsCl gustoće 1,25, a zatim i centrifugiran na Beckman ultracentrifugi u rotoru tipa SW41 tijekom 1 sata i 45 minuta pri temperaturi 20°C i 35 000 x g. Sloj virusa koji se nalazio na granici CsCl različitih gustoća skupljan je u volumenu do 3 mL, prenesen u novu epruvetu za centrifugiranje te dopunjen sa CsCl gustoće 1,34, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje u rotoru SW41 ultracentrifuge Beckman preko noći pri 20°C i 35 000 x g. Centrifugiranjem maksimalno 20 sati stvara se CsCl gradijent u kojem se virus zaustavlja upravo na onom mjestu u gradijentu koji je jednak njegovoj gustoći. Sloj virusa skupljan je u volumenu do 1 mL te je podvrgnut dijalizi u puferu za dijalizu sa 10% glicerola. Pročišćeni virusi su alikvotirani i uskladišteni pri -80°C do upotrebe.

3.2.15. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Broj virusnih čestica (pp, engl. *physical particles*) određuje se mjerenjem apsorbancije pri 260 nm (Mittereder i sur., 1996). Ova spektrofotometrijska metoda koristi se samo za pročišćeni virus.

Pripremljeno je razrjeđenje pročišćenog adenovirusa 5x od 20 µL virusne suspenzije i 80 µL PV pufera za mjerenje koncentracije virusa. Ova otopina inkubirana je 10 minuta pri 56°C. Apsorbancija (A) pri 260 nm mjerena je prema PV puferu.

3.2.16. Određivanje broja infektivnih čestica

Prilikom određivanja broja infektivnih čestica korištena je β-galaktozidaza kao gen dojavljivač koji se nalazi u replikacijski defektnim rekombinantnim Ad5. Nakon infekcije HEK-293 stanica prisutnost virusa u inficiranim stanicama može se dokazati bojenjem na β-galaktozidazu pomoću supstrata X-gal, pri čemu se dobiva plavo obojenje pa se ovakav način titracije naziva b.f.u. od engl. *blue forming units*. Određivanje b.f.u. rađeno je u Petrijevim zdjelicama promjera 3,5 cm, a HEK-293 stanice nasađivane su tako da dan nakon nasađivanja popune oko 80% površine Petrijeve zdjelice. Pripremana su uzastopna deseterostruka razrjeđenja pročišćenih Ad5 u DMEM-FBS. Po 1 mL ovako pripremljenih razrjeđenja (10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} i 10^{-11}) stavlja se u Petrijeve zdjelice iz kojih je prethodno uklonjena sva hranjiva podloga. Infekcija je trajala 1 sat u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ i temperaturi od 37°C. Nakon toga uklonjeni su uzorci razrijeđenih

virusa i na stanice je dodano 2 mL svježje hranjive podloge DMEM-FBS. Petrijeve zdjelice vraćene su u inkubator do sutra. Slijedeći dan stanice u Petrijevim zdjelicama su bojane na ekspresiju β -galaktozidaze. Sa stanica je uklonjena hranjiva podloga, isprane su sterilnim PBS-om (600 μ L po Petrijevoj zdjelici), te su fiksirane tijekom 5 minuta sa 600 μ L 5% otopine glutaraldehida. Nakon dva ispiranja s po 600 μ L sterilnog PBS-a dodano je 600 μ L otopine za bojenje na ekspresiju β -galaktozidaze čija je priprema opisana u odjeljku 3.1.7. Petrijeve zdjelice zamotane su u aluminijsku foliju kako bi se izbjeglo izlaganje svjetlosti, te su stavljene u inkubator pri 37°C i 5% CO₂. Stanice su inkubirane preko noći i plavo obojene stanice brojane su pod svjetlosnim mikroskopom.

3.2.17. Transdukcija RD stanica adenovirusom

Transdukcija je pojam koji označava infekciju stanica replikacijski defektnim Ad5 u kojima nakon ulaska virusa u stanicu ne dolazi do umnažanja virusa pa tako ni stvaranja virusnih čestica.

Za transdukciju korištene su ljudske embrionalne stanice rabdomiosarkoma (engl. *Rhabdomyosarcoma*, RD). 2×10^4 RD stanica nasađivano je u pločicu za uzgoj kultura stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja stanicama su dodana uzastopna dvostruka razrjeđenja pročišćenih virusa u DMEM-FBS čiju transdukciju uspoređujemo. Količina virusa je prethodno normaliziranim na jednak broj virusnih čestica po mL. Stanicama je dodavano po 50 μ L razrjeđenja virusa nakon čega su vraćene u inkubator pri 37°C, a sat vremena nakon toga virusi su uklonjeni sa stanica i dodano je 200 μ L svježje hranjive podloge DMEM-FBS. Dvadeset i četiri sata nakon transdukcije stanice su fiksirane i bojane na ekspresiju β -galaktozidaze kao što je opisano u odjeljku 3.2.17. Određivanje broja infektivnih čestica. Broj plavih stanica određen je brojanjem u svjetlosnom mikroskopu.

4. Rezultati

4.1. Konstrukcija DNA Ad5VLA-4

Rekombinantni adenovirusi se konstruiraju homolognom rekombinacijom u *E.coli* BJ5183 nakon kotransformacije dvaju lineariziranih plazmida: (1) tzv. transfer vektora u kojem se odabrano promijenjeno područje Ad5 genoma nalazi između dovoljno dugih sljedova Ad5 DNA koji omogućavaju homolognu rekombinaciju i (2) plazmida u koji je ugrađena kompletna Ad5 DNA (oko 35 kbp), pocijepana restriksijskom endonukleazom koja cijepa u području smještenom između sljedova homolognih onima u transfer vektoru. Plazmidi su linearizirani zato da u bakterijama ne stvaraju kolonije. Jedini kružni plazmid koji može stvoriti koloniju u bakteriji je onaj koji nastaje homolognom rekombinacijom između ova dva plazmida, a sadrži DNA Ad5 s unesenom promjenom iz transfer vektora.

U poglavlju Materijali (Tablica 3.1.) opisani su plazmidi koji su korišteni u ovom radu. Plazmid VLA-4 je plazmid u koji je ugrađen slijed koji se specifično veže za integrin $\alpha_4\beta_1$ CPLDIDFYC u HI-petlju (Majhen i Ambriović-Ristov, neobjavljeni rezultati). Kako bi konstruirali adenovirus koji sadrži ovaj slijed bilo je potrebno prvo konstruirati transfer vektor, a zatim homolognom rekombinacijom konstruirati odgovarajuću DNA Ad5VLA-4. Konstruirani plazmidi opisani su u Tablici 4.1.

4.1.1. Konstrukcija transfer vektora

Za konstrukciju transfer vektora plazmidu VLA-4 treba proširiti homologne sljedove uzvodno i nizvodno od unesene promjene (ugradnja ciljajućeg slijeda CPLDIDFYC). U tu svrhu korišten je plazmid pBluescriptFb Δ 639 (Ambriović-Ristov i sur., 2003) koji sadrži područje Ad5 genoma dovoljno za homolognu rekombinaciju, od nt 23521 do nt 32452, a koje između ostaloga obuhvaća i cijeli gen Ad5 vlakna s delecijom od 639 parova baza u području drška vlakna (Tablica 3.1.). Kako smo u ovom radu željeli konstruirati plazmid s dugim vlaknom, zamijenili smo u pBluescriptFb Δ 639 odgovarajući dio gena za kratko vlakno i HI petlju u glavi vlakna onime iz pVLA4 (dugo vlakno i preusmjeravajući slijed CPLDIDFYC u HI petlji). Nakon postupka kloniranja u plazmidni vektor, moguća je laka identifikacija željenog plazmida jer se zamjenjuje kraći odsječak (kratko vlakno i kraća-HI petlja) dužim odsječkom (dugo vlakno i ugrađen preusmjeravajući slijed CPLDIDFYC u HI petlju).

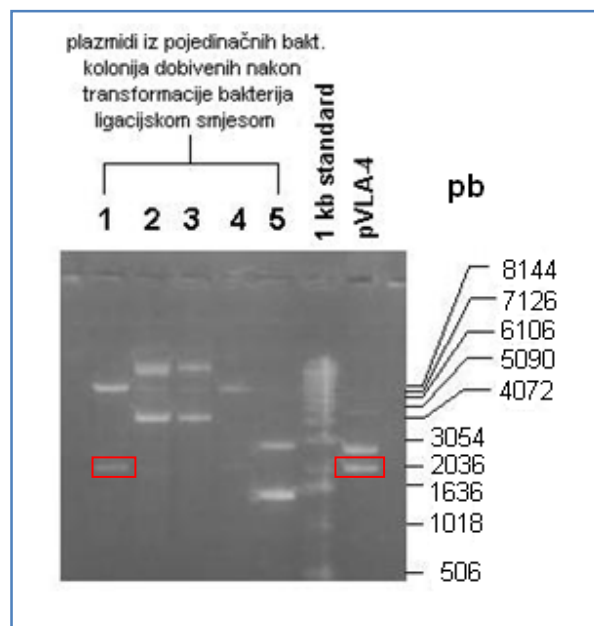
Tablica 4.1. Konstruirani plazmidi i njihove karakteristike

Plazmid	Plazmidna osnova	Veličina (pb)	Gen za otpornost na	Prisutan slijed adenovirusa	Dodatna svojstva
pΣVLA-4	pBlueScript (Stratagene, SAD)	9792	Ampicilin	Područje genoma Ad5 od nt 23521 do nt 32452 koje uključuje i gen za vlakno s ugrađenim nukleotidnim slijedom koji kodira za CPLDIDFYC u HI-petlji	<i>SpeI</i> jedinstveno restrikcijsko mjesto za linearizaciju prije homologne rekombinacije
pAd5VLA-4	pPolyII	35482	Ampicilin	Cijeli genom Ad5 bez gena E1A i E3 regije i gen za vlakno s ugrađenim nukleotidnim slijedom koji kodira za CPLDIDFYC u HI-petlji	<i>PacI</i> restrikcijsko mjesto za oslobađanje jednog kraja Ad5 DNA

Plazmid BluescriptFbΔ639 cijepan je restrikcijskom endonukleazom *NotI*, ovako dobiveni 5' jednolančani odsječak je učinjen ravnim djelovanjem T4 DNA polimeraze, te je zatim plazmid pocijepan restrikcijskom endonukleazom *BamHI*. Plazmid pVLA-4 je pocijepan restrikcijskom endonukleazom *Sall*, ovako dobiven 5' jednolančani odsječak je učinjen ravnim djelovanjem T4 DNA polimeraze, te je zatim plazmid pocijepan restrikcijskom endonukleazom *BamHI*. Oba ovako pocijepana plazmida nanoseni su na gel agaroze i nakon razdvajanja izdvojeni su: vektor (odsječak 7670 pb iz pBluescriptFbΔ639) i insert (2122 pb iz pVLA-4). Po intenzitetu fluorescencije EtBr u gelu agaroze procijenjena je relativna količina vektora i inserta i odgovarajuća količina vektora odnosno inserta izrezana je iz agaroze i pomiješana tako da se

dobije približno molarni omjer vektor : insert = 1 : 3-4. Ovaj molarni omjer preporučen je za spajanje odsječaka koji s jedne strane imaju komplementarne krajeve (*Bam*HI), a s druge strane ravne krajeve (krajevi učinjeni ravnima djelovanjem T4 DNA polimeraze). Iz ove smjese (vektor + insert) izdvojena je DNA i izvođena je reakcija povezivanja uz pomoć enzima T4 DNA ligaza.

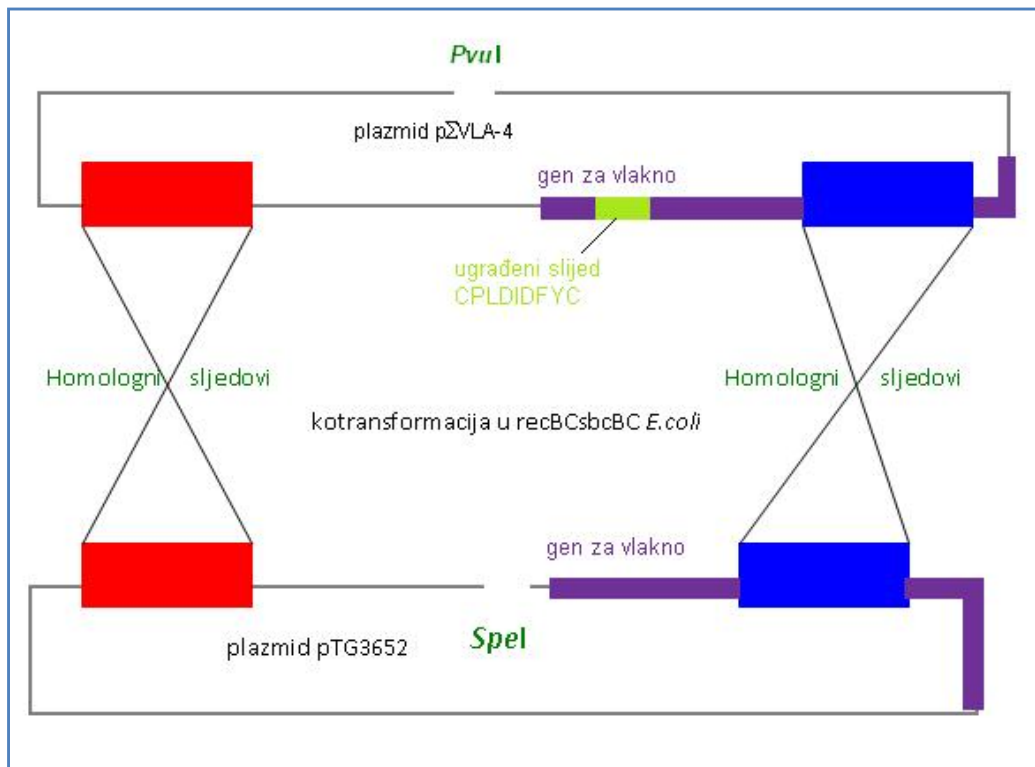
Ligacijskom smjesom su transformirane kompetentne bakterije *E.coli* DH5 α , iz naraslih kolonija umnožene su bakterije, te je iz njih izdvojena plazmidna DNA. Provjera ispravnosti kloniranja izvođena je cijepanjem restriksijskim endonukleazama *Bam*HI i *Xba*I i razdvajanjem u gelu agaroze (Slika 4.1.). Cijepanjem ovim restriksijskim enzimima ishodišni pBluescriptFb Δ 639 daje odsječke duge 7678 i 3586 pb, dok drugi ishodišni pVLA-4 daje odsječke duljine 2116 i 2698 pb. Cijepanjem traženog p Σ VLA4 restriksijskim endonukleazama *Bam*HI i *Xba*I trebaju se dobiti odsječci veličine 2116 i 7676 pb. Plazmidna DNA izdvojena iz kolonije broj 1 cijepanjem spomenutim restriksijskim endonukleazama daje upravo takve odsječke: odsječak od 7676 pb, te odsječak od 2116 pb koji u potpunosti odgovara manjem odsječku dobivenom cijepanjem pVLA-4 (Slika 4.1. odsječak označen crvenim pravokutnikom).



Slika 4.1. Cijepanje enzimima *Bam*HI i *Xba*I plazmidnih DNA izdvojenih iz kolonija dobivenih transformacijom ligacijskom smjesom. Nakon cijepanja uzorci su analizirani razdvajanjem u 0,8% gelu agaroze koji sadrži EtBr (0,5 μ g/mL).

4.1.2. Homologna rekombinacija

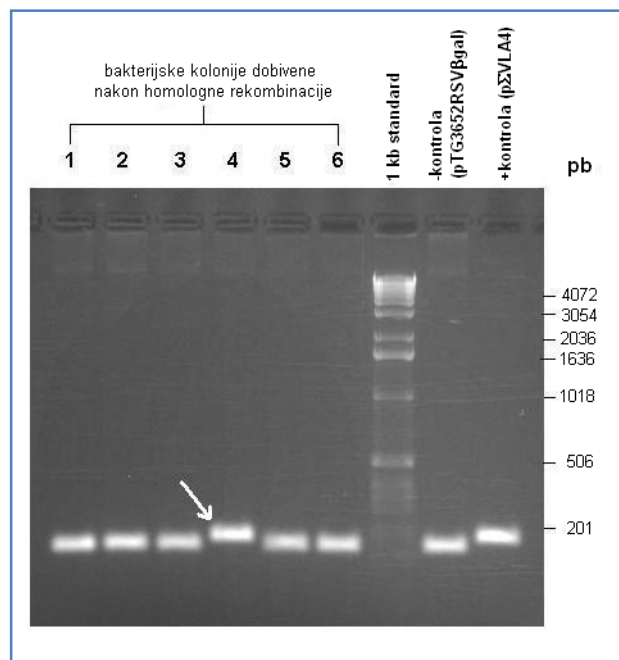
Slijedeći korak u konstrukciji plazmida koji sadrži cjeloviti replikacijski defektni Ad5 genom sa ugrađenim slijedom CPLDIDFYC je homologna rekombinacija plazmida p Σ VLA-4 i pTG3652. Homologna rekombinacija obavljena je u *E.coli* soju BJ5183 koje su prethodno obradom sa CaCl₂ učinjene kompetentnima. Kako bi se onemogućila transformacija svakim od plazmida p Σ VLA-4 i pTG3652, plazmidi su prethodno linearizirani cijepanjem restriksijskim endonukleazama. Tako je pTG3652 lineariziran cijepanjem s restriksijskom endonukleazom *SpeI*, jer sadrži samo jedno *SpeI* restriksijsko mjesto, a koje je smješteno između područja homologije za homolognu rekombinaciju. Plazmid p Σ VLA-4 lineariziran je restriksijskom endonukleazom *PvuI*, koja cijepa u plazmidnoj osnovi, kao što je naznačeno na shemi prikazanoj na slici 4.2.



Slika 4.2. Shema kotransformacije plazmida pTG3652 i p Σ VLA-4 u kompetentnom soju *E.coli* BJ5183 (*recBD sbcBC*). Cijepanje restriksijskim enzimima *PvuI* i *SpeI* naznačeno je kao prekid sive linije. Napomena: Omjeri dužine odsječaka ne odgovaraju stvarnim omjerima dužina.

Nakon homologne rekombinacije učinjen je PCR direktno na bakterijama *E.coli* BJ5183 (kao kalupu) naraslima na čvrstoj hranjivoj podlozi s ampicilinom. Umnažano je područje HI-petlje kako bi se potvrdilo da li dobiveni plazmid sadrži ugrađeni slijed CPLDIDFYC što se onda identificira duljim produktom reakcije PCR, veličine oko 199 parova baza. Razdvajanjem

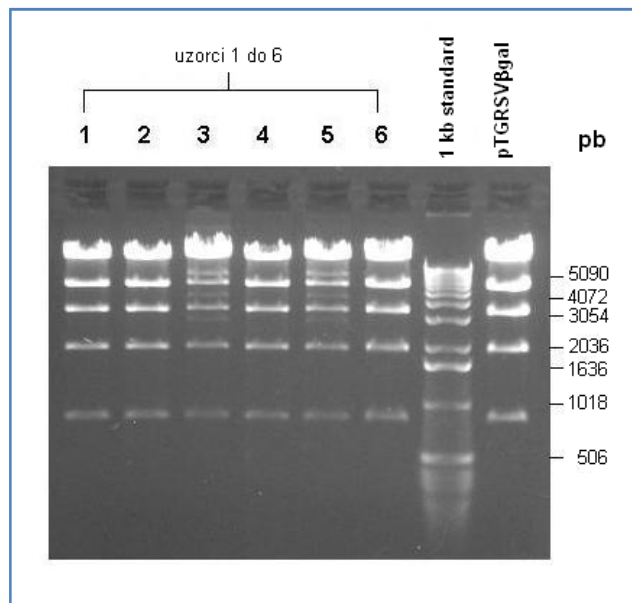
produkata PCR u gelu agaroze i vizualizacijom pomoću EtBr utvrđena je jedna bakterijska kolonija koja sadrži plazmid s ugrađenim odsječkom (Slika 4.3.), pa je iz tih kolonija uzgojenih u tekućem LB mediju izdvojena plazmidna DNA pomoću kompleta i transformacijom je prenesena u *E.coli* DH5 α . Ovaj postupak je nužan kako bi zaštitili potencijalno ispravno konstruirani plazmid od daljnjih mogućih rekombinacija u bakteriji *E.coli* BJ5183, te kako bi se dobila dovoljna količina plazmida iz *E.coli* DH5 α jer je umnažanje plazmida u *E.coli* BJ5183 vrlo slabo.



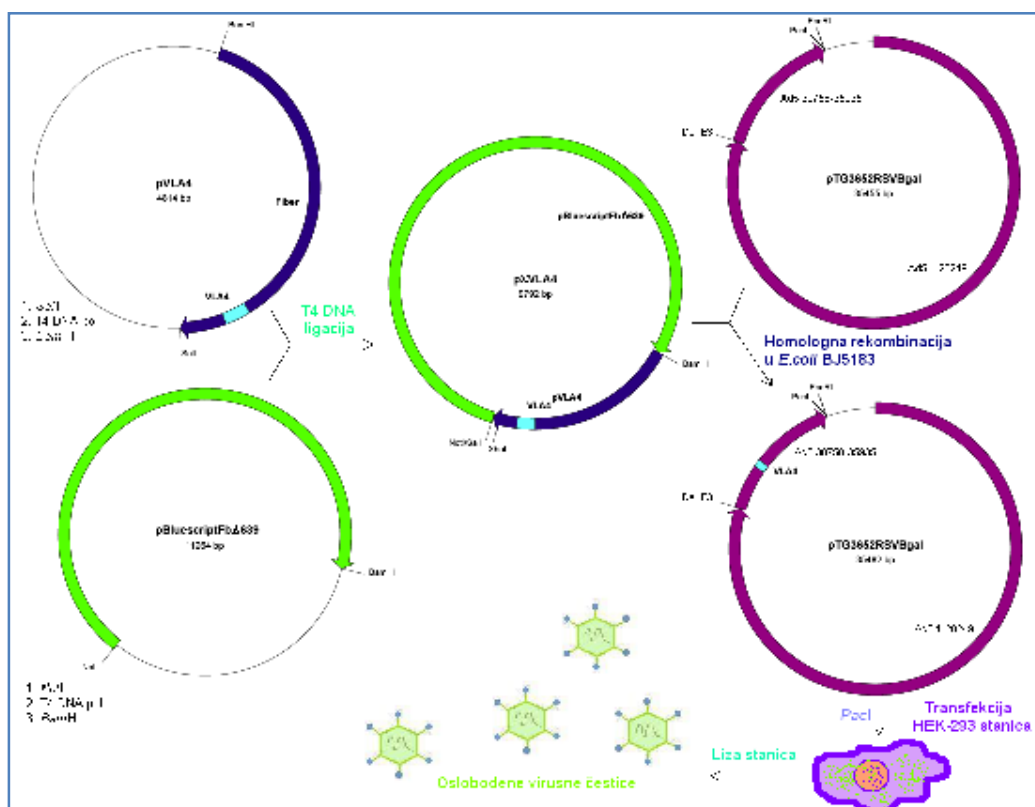
Slika 4.3. Produkti reakcije PCR kojom se umnaža HI petlja razdvojeni u 1,2% gelu agaroze koji sadrži EtBr (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Strelica pokazuje odsječak dobiven umnažanjem dijela plazmida p Δ VLA-4 (HI-petlja) u kojem se nalazi ugrađeni ciljni slijed.

Svaka pojedinačna kolonija dobivena transformacijom *E.coli* DH5 α odabranom DNA nakon homologne rekombinacije je ponovo ispitana reakcijom PCR kako bi se potvrdilo da li dobiveni plazmidi sadrže ugrađene sljedove CPLDIDFYC. Svi plazmidi dali su produkt reakcije koji po veličini na gelu agaroze odgovara onome dobivenom iz p Δ VLA-4, ukazujući na postojanje ugrađenog slijeda CPLDIDFYC (rezultati nisu prikazani). Kako bi se provjerilo da plazmidi sadrže cjelovitu DNA Ad5 provedeno je cijepanje restrikcijom endonukleazom *EcoRI*. Svi izdvojeni plazmidi su nakon cijepanja pokazivali jednak profil kao i pTG3652RSV β -gal, kao što se vidi na slici 4.4.

Schema konstrukcije replikacijski defektnog Ad5VLA4 je prikazana na slici 4.5.



Slika 4.4. Cijepanje restriktivnim enzimom *EcoRI* plazmida dobivenih transformacijom *E.coli* DH5α plazmidom dobivenim homolognom rekombinacijom u *E.coli* BJ5183. Nakon cijepanja uzorci su razdvojeni u 0,8% gelu agaroze koji sadrži EtBr (0,5 μg/mL).



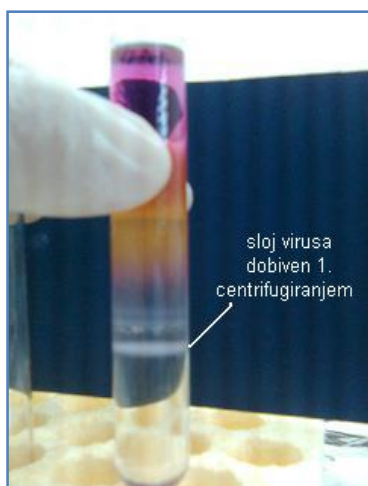
Slika 4.5. Shema konstrukcije replikacijski defektnog Ad5VLA4. Prikazane su sve faze konstrukcije detaljnije opisane u tekstu.

4.2. Dobivanje virusnih čestica Ad5VLA-4, umnažanje i pročišćavanje

Za dobivanje virusnih čestica Ad5VLA-4, plazmid pTGVL4-4 lineariziran je cijepanjem restriksijskom endonukleazom *PacI* i postupkom transfekcije unesen u kulturu bubrežnih stanica ljudskog embrija, HEK-293 (engl. *Human Embryonal Kidney*). Transfekcija je učinjena uz pomoć liposoma, odnosno uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta *Lipofectamine*. Budući da HEK-293 stanice komplementiraju defekt u E1 području adenovirusnog genoma, u njima dolazi do umnažanja virusne DNA, ekspresije virusnih proteina i sklapanja virusnih čestica koje su sposobne osloboditi se iz inficiranih stanica, te inficirati druge stanice. Kako je u početku oslobođenih virusnih čestica malo rade se virusne pasaže sve do trenutka kada se postigne potpuni citopatogeni učinak 48 do 72 sata nakon infekcije, kako je opisano u odjeljku 3.2.13.

Konstruirani pAd5VLA-4 lineariziran je restriksijskim enzimom *PacI* pri čemu se oslobađa jedan virusni ITR (engl. *Inverted Terminal Repeat* = obrnuto ponavljajući slijed) što je dovoljno da se nakon uvođenja u kulturu HEK-293 stanica plazmidna DNA počne ponašati kao virusna i počne umnažati. Potpuni citopatogeni učinak primijećen je već nakon druge pasaže i lizat inficiranih stanica korišten je za inficiranje 40 Petrijevih zdjelica HEK-293 stanica potpunosti 80 do 90%.

Sedamdeset dva sata nakon infekcije, kada je postignut potpuni citopatogeni učinak (stanice su u potpunosti odvojene od podloge), stanice su skupljene, centrifugirane, te je odvojen supernatant. Pročišćavanje virusa nastavlja se iz taloga stanica jer se tamo nalazi glavina virusnih čestica. Virusi se iz stanica oslobađaju tijekom 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, te nakon uklanjanja ostataka stanica centrifugiranjem, virusi se pročišćavaju centrifugiranjem na jastučiću i u gradijentu gustoće cezijeva klorida (detalji su opisani u poglavlju 3. Materijali i metode). Na slikama 4.6. i 4.7. vidi se izdvojeni virusni sloj kao bijela traka. Sloj virusa se odvaja, CsCl se uklanja dijalizom, a virusi se nakon što im je dodano 10% glicerola, pohranjuju pri -80°C u alikvotima.



Slika 4.6. Centrifugiranje na jastučiću CsCl lizata HEK-293 stanica. Bijeli sloj je Ad5VLA-4.



Slika 4.7. Centrifugiranje u gradijentu CsCl Ad5VLA-4 skupljenog sa jastučića CsCl.

4.3. Karakterizacija Ad5VLA-4

Karakterizacija preparacije nekog rekombinantnog adenovirusa podrazumijeva određivanje indeksa infektivnosti (i.i.). Indeks infektivnosti je omjer broja virusnih čestica (engl. *physical particles*, pp) i broja infektivnih virusnih čestica u nekoj preparaciji. Broj infektivnih virusnih čestica se određuje infekcijom HEK-293 stanica koje komplementiraju defekt u replikacijski defektnom Ad5. Ovaj omjer je ujednačen za divlji tip Ad5 i za rekombinantne adenoviruse koji ne posjeduju dodatni slijed za vezanje na neku molekulu na površini stanica na kojoj se mjeri broj infektivnih virusnih čestica. Stanice HEK-293 eksprimiraju malu količina α_4 integrina (Ambriović-Ristov i sur., 2004), no nije poznato da li ove stanice eksprimiraju upravo heterodimer $\alpha_4\beta_1$. Ipak ove stanice se vrlo dobro inficiraju zbog velike ekspresije CAR, pa čak i ako eksprimiraju ovaj integrin, nije za očekivati veliku promjenu u indeksu infektivnosti.

Broj virusnih čestica (engl. *physical particles*, pp) određen je metodom prema Mitterenderu (Mittereder i sur., 1996), mjerenjem apsorbancije pri 260 nm.

Tablica 4.2. pokazuje indeks infektivnosti u odnosu na divlji tip virusa. S obzirom na prethodno spomenutu ekspresiju α_4 , očekivali smo indeks infektivnosti sličan ili čak manji od indeksa infektivnosti za divlji tip Ad5wt. Veći indeks infektivnosti za Ad5VLA-4 nego Ad5wt može biti posljedica nešto manje kvalitete preparacije adenovirusa (onečišćenja povećavaju apsorbanciju pri 260 nm, posljedično tome raste i.i.). Razlika u i.i. može biti i posljedica nepreciznosti upotrijebljenih metoda za njegovo određivanje. Međutim povećani indeks

infektivnosti može biti i posljedica ugradnje ciljajućeg motiva koji mijenja trodimenzionalnu strukturu vlakna što dovodi do smanjenog afiniteta vezanja vlakna na CAR. Primijećeno povećanje je ipak vrlo malo i malo je vjerojatno da će znatno utjecati na sposobnost preusmjerenja na integrin $\alpha_4\beta_1$.

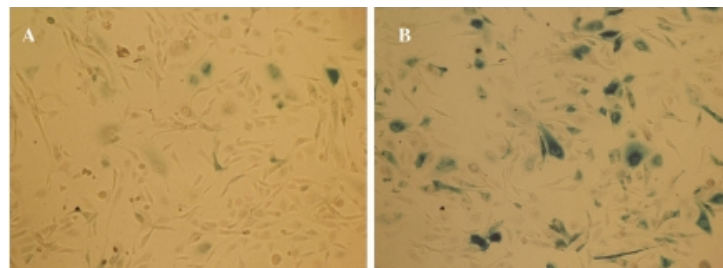
Tablica 4.2. Temeljna obilježja preparacija Ad5wt i Ad5VLA-4.

Tip virusa	pp/mL	b.f.u./mL	i.i.
Ad5wt	$1,065 \times 10^{12*}$	$2,64 \times 10^{10*}$	40,3*
Ad5VLA-4	$3,125 \times 10^{12}$	$3,3 \times 10^{10}$	94,7

*Ad5wt preparacija kao i njene karakteristike preuzete su iz Laboratorija za genotoksične agense ljubaznošću Dragomire Majhen.

4.4. Ad5VLA-4 pokazuje povećanu djelotvornost transdukcije RD stanica koje eksprimiraju $\alpha_4\beta_1$ integrin

Za određivanje uspješnosti preusmjerenja adenovirusa ugradnjom kratkih peptidnih sljedova bez mutacije veznog mjesta za primarni Ad5 receptor CAR, potrebno je odabrati tip stanice koja na svojoj površini eksprimira malu količinu CAR i veliku količinu odabranog receptora. Upravo ovim zahtjevima odgovara RD stanična linija koja eksprimira malu količinu CAR (Dmitriev i sur., 1998) i veliku količinu integrina $\alpha_4\beta_1$ (Saini i sur., 1997). Prema tome ako je konstruirani Ad5VLA-4 sposoban vezati se na integrin $\alpha_4\beta_1$ i posredovati u transdukciji, tada će korištenjem jednakih multipliciteta infekcije (mjereno kao pp/stanici) djelotvornost transdukcije RD stanica biti veća nego za divlji tip adenovirusa Ad5. Na slici 4.8. prikazane su RD stanice transducirane s jednakim m.o.i. Ad5wt i Ad5VLA-4, naknadno obojene na β -galaktozidaznu aktivnost. Transdukcija s Ad5VLA-4 je jako povećana u odnosu na transdukciju Ad5wt; procijenjeno je da je 16 puta bolja nego transdukcija divljim tipom.



Slika 4.8. Bojenje na β -galaktozidaznu aktivnost RD stanica transduciranih s A) Ad5wt i B) Ad5VLA-4, m.o.i.=20 000 pp/st.

5. Rasprava

Genska terapija se definira kao prijenos genskog materijala u stanicu s ciljem postizanja terapijskog učinka, bilo korekcijom prisutnog poremećaja ili unosom u stanicu neke nove funkcije. Prva je ideja genske terapije bila tretman monogenских bolesti, međutim brzo se genska terapija počela koristiti za liječenje krvožilnih i neurodegenerativnih bolesti, nekih infekcija i tumora (Anderson, 1998). Genska terapija tumora se pojavila iz potrebe za prevladavanjem nedostataka klasične terapije. Prema bazi podataka Wiley od prošle godine (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>) 25% od svih vektora namijenjenih genskoj terapiji, a koji se danas primjenjuju u kliničkim istraživanjima, čine vektori temeljeni na adenovirusima. Osim toga ista baza navodi podatak da se čak 65% kliničkih istraživanja odnosi na gensku terapiju tumora. Adenovirusi se smatraju jednim od najsigurnijih vektora za gensku terapiju, posebice za gensku terapiju tumora u kojoj je potrebna djelotvorna i prolazna ekspresija terapijskog gena (Majhen i Ambriović-Ristov, 2006).

Vektori razvijeni na temelju adenovirusa tip 5 se najčešće koriste u genskoj terapiji tumora jer mogu inficirati velik broj različitih vrsta stanica i to one koje se dijele i one koje se ne dijele. Ipak određeni tipovi stanica se zbog nedostatka ekspresije primarnog adenovirusnog receptora (CAR) transduciraju vrlo neučinkovito. Tako CAR nalazimo eksprimiran u stanicama srca, mozga, gušterače, pluća, jetre, nervnog sustava i prostate, ali ga gotovo nema u leukocitima i stanicama glatkog mišića, dendritičnim stanicama i endotelu krvnih žila (Meier i Greber, 2004). Pokazano je da CAR ima ulogu tumor supresora odnosno da je njegova ekspresija smanjena u agresivnih tumora (Okegawa i sur., 2001). Osim ekspresije CAR, za uspješnu internalizaciju Ad5, potrebna je i interakcija integrina $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_3\beta_1$ s RGD motivom iz baze pentona adenovirusa (Davison i sur., 1997, 2001; Huang i sur., 1996; Li i sur., 2001; Salone i sur., 2003; Wickham i sur., 1993). Ukoliko je ekspresija ovih integrina smanjena, također je smanjena mogućnost transdukcije stanica adenovirusom (Krasnykh i sur., 2000).

Kako bi se poboljšala transdukcija stanica koje eksprimiraju malu količinu CAR Krasnykh i suradnici (1998) su predložili koncept genskog preusmjerenja Ad5 ugradnjom kratkih peptidnih motiva u HI-petlju vlakna. HI-petlja vlakna je odabrana zato jer se nalazi na površini glave vlakna, posjeduje određeni stupanj fleksibilnosti pri ugradnji, te nema ulogu u

intramolekularnim interakcijama koje mogu utjecati na stabilnost vlakna (Krasnykh i sur., 1998; 2000). Prvi peptidni slijed čija je ugradnja dovela i do povećane transdukcije je bio RGD4C (CDCGRDCFC) slijed čija je ciljna vezna molekula integrin α_v (Dmitriev i sur., 1998). U HI-petlju ugrađeni su uspješno i peptid NGR4C (CDCNGRCFC) koji se veže na aminopeptidazu N (Majhen i sur., 2006) i SIGYPLP koji se veže na receptore stanica ljudskog endotela (Nicklin i sur., 2001). Vrlo je važno da je kratke peptidne motive moguće koristiti za preusmjeravanje čak i onda kada nije poznat receptor na koji se veže; dovoljno je da se potvrdi vezanje preusmjeravajućeg peptida na ciljne stanice u usporedbi s drugim stanicama.

Jäger i suradnici (2007) su metodom otkrivanja faga izdvojili ligand koji se specifično veže za integrin $\alpha_4\beta_1$. U ovom radu konstruirali smo Ad5VLA-4 ugradnjom CPLDIDFYC motiva u HI-petlju vlakna. Pokazali smo da ugradnja peptidnog motiva u HI-petlju vlakna nije znatno utjecala na sposobnost ovog virusa da inficira HEK-293 komplementirajuće stanice. Indeks infektivnosti za VLA-4 je približno dva puta veći nego za Ad5wt. To može biti posljedica nesavršenosti preparacije virusa, ali i utjecaja ugradnje peptidnog motiva na trodimenzionalnu strukturu vlakna. Međutim, Ad5VLA-4 je uspješno preusmjeren na integrin $\alpha_4\beta_1$ što je pokazano značajno povećanom (oko 16 puta) djelotvornosti transdukcije RD stanica, koje na svojoj površini eksprimiraju integrin $\alpha_4\beta_1$, u odnosu na divlji tip Ad5wt.

Budući da je pokazano da stanice akutne mijeloičke leukemije (engl. *Acute Myeloid Leukemia*, AML) na svojoj površini eksprimiraju integrin $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4), pretpostavljamo da bi se ovaj virus mogao koristiti za gensku terapiju AML. Osim što Ad5VLA-4 snažno povećava transdukciju $\alpha_4\beta_1$ integrin pozitivnih stanica (RD), još je jedan razlog zašto bi ovaj virus mogao biti vrlo dobar vektor za gensku terapiju AML. Pokazano je da interakcija između AML stanica koje eksprimiraju $\alpha_4\beta_1$ i fibronektina na stanicama strome koštane srži odgovorna za otpornost na citostatike i za ponovnu pojavu bolesti nakon kemoterapije. Osim toga razina ekspresije integrina $\alpha_4\beta_1$ na leukemijskim stanicama negativno korelira s prognozom bolesti (Matsunaga i sur., 2003). Ako je to tako, onda će Ad5 vektor preusmjeren na $\alpha_4\beta_1$ integrin imati to veću djelotvornost transdukcije što su leukemijske stanice otpornije na citostatike, odnosno što je lošija prognoza bolesti.

Ligandi na koje se veže integrin $\alpha_4\beta_1$ su trombospondin, fibronektin i VCAM-1 (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule*). VCAM-1 je član grupe adhezivnih molekula koje se induciraju lokalno upalnim citokinima. Adhezija posredovana integrinom $\alpha_4\beta_1$ eksprimiranom na subpopulacijama limfocita i VCAM-1 eksprimiranom na aktiviranom endotelu je prvi događaj u izlasku stanica u upalno tkivo. Povećana ekspresije integrina $\alpha_4\beta_1$ je pronađena i u stanicama melanoma i također predstavlja biljeg loše prognoze melanoma jer potiče metastaziranje i to na način da tumorske stanice sa ekspresijom $\alpha_4\beta_1$ imitiraju leukocite i uz pomoć VCAM-1 na stanicama endotela prodiru u tkiva i stvaraju metastaze (Johnson, 1999).

Integrin $\alpha_4\beta_1$ nije jedini integrin za koji je pokazano da se povećano eksprimira u tumorskim stanicama, da mu je ekspresija povezana s razvojem otpornosti na citostatike i da ima ulogu u transdukciji Ad5 (Ambriović-Ristov i Osmak, 2006). Ambriović-Ristov i suradnici (2004) su pronašli povećanu ekspresiju $\alpha_v\beta_3$ integrina u ljudskim stanicama karcinoma grkljana (HEp2) otpornim na cisplatinu te su pretpostavili da bi povećana ekspresija ovog integrina mogla biti povezana s otpornosti. Ista grupa autora nedavno je pokazala da su HEp2 stanice koje ekspimiraju povećanu količinu $\alpha_v\beta_3$ integrina otporne na tri citostatika: cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C (Brozović i sur., 2008). Budući da Ad5 koristi integrin $\alpha_v\beta_3$ za internalizaciju, povećanje njegove ekspresije utječe i na povećanu djelotvornost transdukcije divljim tipom Ad5. Prema tome, ako se pokaže da ovaj mehanizam postoji i *in vivo*, tada bi tumori koji su postali otporni na citostatike zbog povećanja ekspresije $\alpha_v\beta_3$ integrina bili bolja meta za gensku terapiju tumora adenovirusima, odnosno bila bi potrebna manja doza virusa za jednak terapijski učinak (Ambriović-Ristov i sur., 2004).

Pokazano je da integrini posreduju direktnu internalizaciju, odnosno direktni ulazak virusne čestice u stanicu. Primarni adenovirusni receptor CAR, za razliku od integrina, to ne može i služi samo kao receptor za vezanje nakon čega se internalizacija Ad5 potiče vezanjem RGD slijeda Ad5 pentona i integrina na površini stanice (Magnusson i sur., 2001; Majhen i sur., 2009). Za fage koji ekspimiraju CPLDIDFYC slijed i vežu se na $\alpha_4\beta_1$ je pokazano da potiču internalizaciju (Jäger i sur., 2007), stoga je vrlo vjerojatno da to može i slijed CPLDIDFYC ugrađen u Ad5VLA-4. Međutim ovu pretpostavku treba još eksperimentalno potvrditi.

U ovom radu smo konstruirali Ad5VLA-4 koji inficira stanice specifičnim vezanjem i/ili internalizacijom posredstvom integrina $\alpha_4\beta_1$. Kao modelni sustav koristili smo RD stanice koje eksprimiraju integrin $\alpha_4\beta_1$, no krajnji cilj ovog rada je upotrijebiti ovaj preusmjereni Ad5VLA-4 za liječenje AML. Jedna od mogućnosti daljnjeg razvoja Ad5VLA-4 je ugradnja samoubilačkih gena koji kodiraju enzime potrebne za pretvorbu netoksičnih lijekova u toksične produkte sposobne ubiti tumorsku stanicu. Jedna od najčešće korištenih kombinacija enzim/prolijek u tu svrhu je timidin kinaza iz *Herpes Simplex Virusa* (HSV) i ganciklovir. Drugi mogući pristup genskoj terapiji tumora preusmjerenim Ad5VLA-4 je unos u stanicu gena za tumor supresor npr. p53 koji može u tumorskim stanicama izazvati apoptozu (Majhen i Ambriović-Ristov, 2006).

Razvoj genske terapije je započeo 1990. godine i od tada je istražena njena učinkovitost za liječenje mnogih za život opasnih bolesti kao što su infektivne bolesti, tumori, bolesti krvožilnog sustava, te nasljedne bolesti. Iako je prvi veliki uspjeh genske terapije, a to je izlječenje imunodeficijencije retrovirusnim vektorom, postignut u francuskoj bolnici Necker (Cavazzana-Calvo i sur, 1999) nije se očekivalo brzo odobrenje genske terapije kao lijeka. Ipak 2003. godine Kina odobrava lijek Gendicine (Ad5p53) za liječenje tumora glave i vrata. Da li je to početak nove ere u liječenju tumora pokazat će budućnost. Unatoč brojnim preprekama, treba razvijati nove terapije omogućene brzim razvojem novih tehnologija u molekularnoj biologiji i medicini.

6. Zaključci

Na temelju rezultata ovog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Konstruirali smo replikacijski defektni Ad5VLA-4 ugradnjom motiva CPLDIDFYC u HI-petlju glave vlakna adenovirusa tipa 5.
2. Određivanjem indeksa infektivnosti (omjer broja fizičkih čestica i broja infektivnih čestica) za preparaciju pročišćenog Ad5VLA-4 pokazali smo da je indeks infektivnosti oko dva puta veći nego indeks infektivnosti divljeg tipa Ad5. Ovo može biti odraz promjene trodimenzionalne strukture vlakna Ad5VLA-4 zbog ugradnje motiva CPLDIDFYC što dovodi do smanjenja infektivnosti posredovane sa CAR na bubrežnim stanicama ljudskog embrija HEK-293. Međutim povećani indeks infektivnosti može biti i posljedica nesavršene pojedinačne preparacije Ad5VLA-4.
3. Ad5VLA-4 pokazuje oko 16 puta bolju transdukciju stanica rabdomyosarkoma koje eksprimiraju integrin $\alpha_4\beta_1$. Prema tome Ad5VLA-4 bi se mogao koristiti za djelotvorni unos u stanice tumora koji eksprimiraju integrin $\alpha_4\beta_1$ kao što je akutna mijeloička leukemija.

7. Literatura

- 1. Alba R., Bosch A., Chillon M. (2005):** Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy* **12**: S18-27.
- 2. Ambriović-Ristov A., Mercier S., Eloit M. (2003):** Shortening adenovirus type 5 fiber shaft decreases the efficiency of postbinding steps in CAR-expressing and nonexpressing cells. *Virology* **312**: 425-433.
- 3. Ambriović-Ristov A., Gabrilovac J., Čimbora-Zovko T., Osmak M. (2004):** Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ and coxsackie adenovirus receptor. *International Journal of Cancer* **110**: 660-667.
- 4. Ambriović-Ristov A., Osmak M. (2006):** Integrin-mediated drug resistance. *Current Signal Transduction Therapy* **1**: 1-11.
- 5. Ambriović-Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Hranilović D., Herak Bosnar M., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007):** Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- 6. Anderson W. F. (1998):** Human gene therapy. *Nature* **392**: 25-30.
- 7. Baker A. H. (2002):** Future developments in gene therapy. *Heart Metabolism* **18**: 28-35.
- 8. Belousova N., Krendelchtchikova V., Curiel D. T., Krasnykh V. (2002):** Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein. *Journal of Virology* **76**: 8621–8631.
- 9. Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W. (1997):** Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**: 1320-1323.
- 10. Bett A. J., Prevec L., Graham F. L. (1993):** Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *Journal of Virology* **67**: 5911-5921.
- 11. Brozović A., Majhen D., Roje V., Mikac N., Jakopec S., Fritz G., Osmak M., Ambriović-Ristov A. (2008):** $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated drug resistance in human laryngeal carcinoma cells is caused by glutathione-dependent elimination of drug-induced reactive oxidative species. *Molecular Pharmacology* **74**: 298-306.

12. **Cann A. J. (2005):** Principles of molecular virology. Elsevier, Oxford.
13. **Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J. L., Bousso P., Deist F. L., Fischer A. (1999):** Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669-672.
14. **Chartier C., Degryse E., Gantzer M., Dieterle A., Pavirani A., Mehtali M. (1996):** Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Virology* **70**: 4805-4810.
15. **Contreras J. L., Smyth C. A., Curiel D. T., Eckhoff D. E. (2004):** Nonhuman primate models in type 1 diabetes research. *ILAR Journal* **45**: 334-342.
16. **Davison E., Diaz R. M., Hart I. R., Santis G., Marshall J. F. (1997):** Integrin $\alpha_5\beta_1$ -mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody. *Journal of Virology* **71**: 6204-6207.
17. **Davison E., Kirby I., Whitehouse J., Hart I., Marshall J. F., Santis G. (2001):** Adenovirus type 5 uptake by lung adenocarcinoma cells in culture correlates with Ad5 fibre binding is mediated by $\alpha_v\beta_1$ integrin and can be modulated by changes in β_1 integrin function. *Journal of General Medicine* **3**: 550-559.
18. **de Melker A. A., Sonnenberg A. (1999):** Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* **21**: 499-509.
19. **Dmitriev I., Krasnykh V., Miller C. R., Wang M., Kashentseva E., Mikheeva G., Belousova N., Curiel D. T. (1998):** An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *Journal of Virology* **72**: 9706-9713.
20. **Glasgow J. N., Bauerschmitz G. J., Curiel D. T., Hemminki A. (2004):** Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications. *Current Gene Therapy* **4**: 1-14.
21. **Glasgow J. N., Everts M., Curiel D. T. (2006):** Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Therapy* **13**: 830-844.
22. **González-Amaro R., Mittelbrunn M., Sánchez-Madrid F. (2005):** Therapeutic anti integrin (α_4 and α_L) monoclonal antibodies: two-edged swords? *Immunology* **116**: 289-296.

- 23. Graham F. L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. (1977):** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* **36**: 59-72.
- 24. Huang S., Kamata T., Takada Y., Ruggeri Z. M., Nemerow G. R. (1996):** Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *Journal of Virology* **70**: 4502-4508.
- 25. Hynes R. O. (2002):** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673–687.
- 26. Jäger S., Jahnke A., Wilmes T., Adebahr S., Vögtle F.-N., deLima-Hahn E., Pfeifer D., Berg T., Lübbert M., Trepel M. (2007):** Leukemia targeting ligands isolated from phage display peptide libraries. *Leukemia* **21**: 411-420.
- 27. Johnson J. P. (1999):** Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews* **18**: 345-357.
- 28. Koivunen E., Arap W., Rajotte D., Lahdenranta J., Pasqualini R. (1999):** Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *The Journal of Nuclear Medicine* **40**: 883-888.
- 29. Krasnykh V., Dmitriev I., Mikheeva G., Miller C. R., Belousova N., Curiel D. T. (1998):** Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *Journal of Virology* **72**: 1844-1852.
- 30. Krasnykh V., Dmitriev I., Navarro J.-G., Belousova N., Kashentseva E., Xiang J., Douglas J. T., Curiel D. T. (2000):** Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity. *Cancer Research* **60**: 6784–6787.
- 31. Leppard K. N. (1997):** E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno associated virus infections. *Journal of General Virology* **78**: 2131–2138.
- 32. Li E., Stupack D., Bokoch G. M., Nemerow G. R. (1998):** Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *Journal of General Virology* **72**: 8806–8812.
- 33. Li E., Brown S. L., Stupack D. G., Puente X. S., Cheres D. A., Nemerow G. R. (2001):** Integrin $\alpha_v\beta_1$ is an adenovirus coreceptor. *Journal of Virology* **75**: 5405-5409.

- 34. Magnusson M. K., Hong S. S., Boulanger P., Lindholm L. (2001):** Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fiber. *Journal of Virology* **75**: 7280-7289.
- 35. Majhen D., Gabrilovac J., Eloit M., Richardson J., Ambriović-Ristov A. (2006):** Disulfide bond formation in NGR fiber-modified adenovirus is essential for retargeting to aminopeptidase N. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**: 278-287.
- 36. Majhen D., Ambriović-Ristov A. (2006):** Adenoviral vectors—How to use them in cancer gene therapy? *Virus Research* **119**: 121-133.
- 37. Majhen D., Nemet J., Richardson J., Gabrilovac J., Hajsig M., Osmak M., Eloit M., Ambriović-Ristov A. (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 Research* **139**: 64–73.
- 38. Mathews M. B., Shenk T. (1991):** Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *Journal of Virology* **65**: 5657-5662.
- 39. Matsunaga T., Takemoto N., Sato T., Takimoto R., Tanaka I., Fujimi A., Akiyama T., Kuroda H., Kawano Y., Kobune M., Kato J., Hirayama Y., Sakamaki S., Kohda K., Miyake K., Niitsu Y. (2003):** Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *National Medicine* **9**: 1158-1165.
- 40. Meier O., Greber U. F. (2004):** Adenovirus endocytosis. *Journal of General Medicine* **6**: S152-163.
- 41. Mittereder N., March K. L., Trapnell B.C. (1996):** Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *Journal of Virology* **70**: 7498-7509.
- 42. Nicklin S. A., Von Seggern D. J., Work L. M., Pek D. C. K., Dominiczak A. F., Nemerow G. R., Baker A. H. (2001):** Ablating adenovirus type 5 fiber–CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Molecular Therapy* **4**: 534-542.
- 43. Okegawa T., Pong R. C., Li Y., Bergelson J. M., Sagalowsky A. I., Hsieh J. T. (2001):** The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on

human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Research* **61**: 6592-6600.

44. Rein D. T., Breidenbach M., Curiel D. T. (2006): Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncology* **2**: 137–143.

45. Rowe W. P., Huebner R. J., Gilmore L. K., Parrott R. H., Ward T. G. (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **84**: 570-573.

46. Russell W. C. (2000): Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology* **81**: 2573–2604.

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

48. Saini A., Sellar Z., Davies D., Marshall J. F., Hart I. R., (1997): Activation status and function of the VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) integrin expressed on human melanoma cell lines. *International Journal of Cancer* **73**: 264-270.

49. Salone B., Martina Y., Piersanti S., Cundari E., Cherubini G, Franqueville L., Failla C. M., Boulanger P., Saggio I. (2003): Integrin $\alpha_3\beta_1$ is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5. *Journal of Virology* **77**: 13448-13454.

50. Takada Y., Ye X., Simon S. (2007): The integrins. *Genome Biology* **8**: 1-9.

51. Tomko R. P., Xu R., Philipson L. (1997): HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 3352-3356.

52. Wickham T. J., Mathias P., Cheresch D. A., Nemerow G. R. (1993): Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**: 309-319.

53. Zhang Y., Bergelson J. M. (2005): Adenovirus receptors. *Journal of Virology* **79**: 12125–12131.

8. Životopis

Rođena sam 24.07.1985. godine u Zagrebu, gdje sam i započela svoje školovanje. Od 1992. do 2000. godine pohađala sam osnovnu školu Antuna Gustava Matoša u Zagrebu i završila je s odličnim uspjehom. Od 2000. do 2004. pohađala sam II. Križanićevu Gimnaziju i završila je također s odličnim uspjehom.

Tokom školovanja sudjelovala sam na 5 natjecanja iz: engleskog jezika, talijanskog jezika, latinskog jezika, fizike i biologije, od kojih najvećim uspjehom smatram sudjelovanje na državnom natjecanju iz latinskog jezika održanom 2002. godine na otoku Krku.

Godine 2004. upisala sam studij molekularne biologije na Prirodoslovno Matematičkom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U ljetnom semestru akademske godine 2005./2006. te akademske godine 2006./2007. radila sam kao demonstrator iz kolegija Mikrobiologija kod Prof. dr. sc. Božidara Stilinovića i Doc. dr. sc. Jasne Hrenović. Diplomski rad započela sam u veljači 2008. godine u Laboratoriju za Genotoksične Agense Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Studij sam apsolvirala u rujnu 2008. godine.

Posjedujem aktivno znanje engleskog, talijanskog, španjolskog i njemačkog jezika, kao i osnovno znanje o radu na računalima.

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

1. Jelušić, Tihana; Majhen, Dragomira; Ambriović-Ristov, Andreja. RETARGETING ADENOVIRUS TYPE 5 TO INTEGRIN $\alpha_4\beta_1$, ADENOVIRUSES: BASIC BIOLOGY TO GENE THERAPY, Zadar 23-24. September, 2008.
2. Jelušić, Tihana; Majhen, Dragomira; Ambriović-Ristov, Andreja. PREUSMJERAVANJE ADENOVIRUSA TIP 5 NA $\alpha_4\beta_1$ INTEGRIN // 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zagreb 30.-21. studeni, 2008.