

# ULOGA RAB PROTEINA U INFEKCIJI ADENOVIRUSA

---

**Biškup, Klara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Health Studies / Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:610875>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Health Studies - FHSRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
KLINIČKI NUTRICIONIZAM

Klara Biškup

**ULOGA RAB PROTEINA U INFEKCIJI ADENOVIRUSA**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF HEALTH STUDIES  
GRADUATE UNIVERSITY STUDY  
CLINICAL NUTRITION

Klara Biškup

**ROLE OF RAB PROTEINS IN ADENOVIRUS INFECTION**

Graduate thesis

Rijeka, 2020.

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Kraljević Pavelić i u suradnji s Laboratorijem za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod neposrednim vodstvom dr. sc. Ksenije Božinović.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić na stručnom vodstvu, pomoći te svim izlascima u susret tijekom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem na nesebičnom dijeljenju znanja, kvalitetnim i zanimljivim predavanjima koja su potakla moj još veći interes prema znanosti.*

*Zahvaljujem dr. sc. Kseniji Božinović na svom trudu, strpljenju i vremenu koji je uložila u ovaj diplomski rad. Također hvala na podršci, stalnoj motivaciji, svakom savjetu koji je podijelila sa mnom prilikom rada u laboratoriju. A najviše se zahvaljujem na njenoj dobroti i ljubavi prema znanosti s kojom sam naučila da se u životu ničega ne treba bojati, nego biti spreman učiti.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Dragomiri Majhen na pruženoj prilici s kojom mi je omogućila ostvarenje dijela sna te na svim poticajima i motivaciji prilikom rada u laboratoriju.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, ocu Radovanu, majci Mirjani, bratu Nikoli i baki Đurđici koji su mi omogućili nesmetano školovanje te pružili podršku i motivaciju u svim trenucima u životu.*

*Zahvaljujem se prijateljici Mari na svakom trenutku i savjetu koji je podijelila sa mnom, te na svakoj kavi na koju sam došla s problemom a otišla sa smoješkom.*

*Zahvaljujem se dečku Domagoju na ogromnoj podršci, savjetu, ljubavi i držanju leđa kada je bilo najpotrebnije.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Rijeci  
Fakultet zdravstvenih studija

Diplomski rad

### ULOGA RAB PROTEINA U INFEKCIJI ADENOVIRUSA

*Klara Biškup (broj indeksa:0248056308)*

#### SAŽETAK

Adenovirusi su DNA virusi i pripadaju obitelji *Adenoviridae*, rodu *Mastadenovirus* a njihova su molekularna i biološka svojstva dobro poznata. Također radi se o virusima čijim se genomom lako manipulira, a mogu se koristiti i za uspješan unos virusnog genoma u stanicu domaćina, zbog čega su to dobri vektori za prijenos gena u svrhu genske terapije i vakcinacije. Da bi infekcija adenovirusa bila uspješna, potrebni su različiti stanični proteini, koje adenovirus koristi kako bi uspješno dostavio svoj genom u jezgru stanice domaćina i osigurao ekspresiju vlastitih gena. U tu grupu proteina koji su važni u procesu infekcije spadaju i Rab proteini koji čine najveću obitelj malih enzima GTPaza i kontroliraju različite korake unutarstaničnog transporta. Za uspješnu infekciju adenovirusa najvažniji su Rab proteini Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11. Upravo je razumijevanje dinamike Rab proteina i njihove uključenosti u unutarstanični transport, važno za rasvjetljavanje mehanizma adenovirusne infekcije, endocitoze kao procesa te razvijanje novih strategija u pristupu liječenja raznih bolesti nastalih poremećajem funkcije Rab proteina. Ovaj diplomski rad stoga daje detaljni teorijski pregled o ulozi Rab proteina u infekciji stanica čovjeka adenovirusom.

**Ključne riječi:** adenovirusi, endocitoza, Rab5, Rab7, Rab9, Rab11

**Rad sadrži:** 57 stranice, 17 slika, 4 tablice, 90 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Mentor:** Prof. dr. sc. Sanda Kraljević Pavelić

**Neposredno vodstvo:** dr. sc. Ksenija Božinović

Diplomski rad obranjen je dana 29.09.2020 na Fakultetu zdravstvenih studija u Rijeci.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Predsjednik povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica
2. Član povjerenstva: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić
3. Član povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Aleksandar Bulog

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Rijeka  
Faculty of health studies

Graduate thesis

### ROLE OF RAB PROTEINS IN ADENOVIRUS INFECTION

*Klara Biškup (index number:0248056308)*

#### ABSTRACT

Adenoviruses are DNA viruses that belong to the *Adenoviridae* family, genus *Mastadenovirus* and their molecular biology is well-known. They are also viruses whose genome is easily manipulated, and can very successfully introduce the viral genome into the host cell, which has shown why they are recognized as excellent candidates for gene therapy and vaccination purposes. In order to maintain efficient infection, adenoviruses use different cellular proteins to successfully deliver genome into the cell nucleus and ensure the expression of its own genes. One of the most important proteins involved in adenovirus infection are Rab proteins, which make the largest family of small GTPases and control the various steps of intracellular transport. Understanding the dynamics of Rab proteins and their involvement in intracellular transport, allows better understanding of the adenoviral infection mechanism, endocytosis as a process and development of new strategies in the treatment of various diseases caused by Rab protein dysfunction. This thesis consists of a detailed theoretical overview of the Rab protein role in human adenovirus cell infection, specifically Rab5, Rab7, Rab9 and Rab11.

**Keywords:** adenoviruses, endocytosis, Rab5, Rab7, Rab9, Rab11

**Thesis contains:** 57 pages, 17 figures, 4 tables, 90 references

**Original in:** Croatian



**Mentor:** Prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

**Direct management:** dr. sc. Ksenija Božinović

Graduate thesis was defended on 29.09.2020 at the Faculty of Health Studies in Rijeka.

**Reviewers:**

1. Chairman of the commission: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica
2. Committee member: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić
3. Committee member: izv. prof. dr. sc. Aleksandar Bulog

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. ADENOVIRUSI.....	3
<b>2.1. Struktura adenovirusa.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Genom adenovirusa.....</b>	<b>8</b>
3. ŽIVOTNI CIKLUS ADENOVIRUSA.....	10
<b>3.1. Vežanje virusa na receptor stanice domaćina .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Ulazak virusa u stanicu-Endocitoza .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.1. Klatrinom posredovana endocitoza .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.2. Kaveolinom posredovana endocitoza.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.3. Makropinocitoza .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.4. Fagocitoza.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Izlazak virusa (bijeg) iz endosoma i putovanje kroz citoplazmu.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4. Ulazak adenovirunog genoma u jezgru stanice domaćina .....</b>	<b>22</b>
4. PRIMJENA ADENOVIRUSA.....	24
<b>4.1. Adenoviralni vektori .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Genska terapija .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Cjepivo.....</b>	<b>31</b>
5. ULOGA RAB PROTEINA U INFEKCIJI ADENOVIRUSA.....	33
<b>5.1. Struktura Rab proteina .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2. Obitelj Rab proteina .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3. Ključni Rab proteini u endocitnom putu adenovirusa .....</b>	<b>38</b>
<b>5.3.1. Rab 5.....</b>	<b>38</b>
<b>5.3.2. Rab 7.....</b>	<b>38</b>

<b>5.3.3. Rab 9</b> .....	39
<b>5.3.4. Rab 11</b> .....	39
<b>5.4. Regulatori Rab proteina</b> .....	41
<b>5.5. Poremećaj Rab proteina</b> .....	42
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	45
<b>7. LITERATURA</b> .....	47

## 1. UVOD

Virusi su po mnogočemu zanimljivi i specifični organizmi koji se ne uklapaju u definiciju života te ih se zbog toga često karakterizira kao čestice na granici živog svijeta i nežive prirode. Virusi se prvobitno dijele na temelju genetskog materijala iliti nukleinske kiseline na DNA ili RNA viruse. DNA virusi najčešće sadrže dvolančanu DNA (dsDNA) i rijetko jednolančanu DNA (ssDNA). Dok RNA virusi najčešće imaju jednolančanu RNA (ssRNA), ali mogu sadržavati i dvolančanu RNA (dsRNA). Virusna čestica sastoji se od dvije osnovne komponente: nukleinske kiseline (dsDNA, ssDNA, ssRNA, dsRNA) i proteinskog omotača (kapside) koji služi za zaštitu virusnog genoma te tijekom infekcije veže virion na specifični receptor stanice domaćina. Zahvaljujući vrlo malim veličinama genoma, virusi imaju ograničene životne sposobnosti i moraju ući u stanice domaćina kako bi se umnožili i razmnožavali, te su tako razvili različite strategije za manipulaciju mehanizmima stanica domaćina kako bi kontrolirali vlastiti životni ciklus i onemogućili antivirusni odgovor imunološkog sustava domaćina. Među njima, dobro su poznati i istraženi adenovirusi. Adenovirusi su DNA virusi koji pripadaju obitelji *Adenoviridae*, rodu *Mastadenovirus* koji se zbog njihove dobro poznavane molekularne biologije, lake manipulacije genoma te vrlo uspješnog unosa virusnog genoma u stanicu domaćina pokazali kao izvrsni kandidati za prijenos gena u svrhu genske terapije i vakcinaciji. Korištenje adenovirusnih vektora prvobitno mora biti sigurno. Kako bi se to postiglo potrebno je ukloniti dijelove genoma odgovorne za replikaciju te omogućiti ugradnju stranog genetskog materijala. Kroz niz godina unaprjeđenjem tehnika i raznim ispitivanjima konstruirani su adenovektori prve, druge i treće generacije. Optimizirani adenovektor u genskoj terapiji sadrži ITR (engl. *Inverted Terminal Repeats*), sekvencu za pakiranje, transgen s promotorom, procesiranje RNA te je jedan od glavnih preduvjet za korištenje adenovirusnih vektora da stanice eksprimiraju receptor CAR (engl. *Coxsackie adenovirusni receptor*).

Da bi infekcija adenovirusa bila uspješna potrebni su različiti stanični proteini, koje adenovirus iskorištava kako bi uspješno dostavio svoj genom u jezgru stanice i osigurao ekspresiju vlastitih gena. Važni proteini koji sudjeluju u infekciji adenovirusom su primjerice Rab proteini koji čine najveću obitelj malih GTPaza i kontroliraju različite korake unutarstaničnog transporta.

Razumijevanje dinamike Rab proteina i njihove uključenosti u unutarstanični transport omogućava rasvjetljavanje mehanizma adenovirusne infekcije, endocitoze kao procesa te razvijanje novih strategija u pristupu liječenja raznih bolesti nastalih poremećajem funkcije Rab proteina.

Ovaj diplomski rad sastoji se od detaljnog teorijskog pregleda o ulozi Rab proteina u infekciji stanica čovjeka adenovirusom. U prvom dijelu rada objašnjava se struktura adenovirusa, kao i organizacija adenoviralnog genoma.

S obzirom na velik broj kliničkih istraživanja u kojima se adenovirusi koriste kao vektori za prijenos gena odnosno vakcinaciju objašnjeno je kako se konstruiraju adenoviralni vektori i napravljen je pregled istraživanja u kojima su korišteni adenoviralni vektori zadnjih 30 godina.

U posebnom poglavlju detaljno je objašnjen životni ciklus adenovirusa, koji započinje vezanjem adenovirusa za receptor na staničnoj membrani i nastavlja se internalizacijom virusa, odnosno ulaskom virusa u stanicu. Za sam ulazak u stanicu virus koristi dobro poznate mehanizme endocitoze. Pošto postoji nekoliko različitih tipova endocitoze, objašnjeni su glavni putevi koje adenovirusi koriste za uspješnu internalizaciju u stanicu domaćina. Nakon što je virus ušao u stanicu, opisuje se unutarstanično putovanje virusa od stanične membrane pa sve do jezgre, u koju virus dostavlja svoju genomsku DNA, kako bi se eksprimirali virusni geni i upakirale nove virusne čestice.

Životni ciklus adenovirusa završava oslobađanjem adenoviralnih čestica iz stanice, a samom dostavom genoma u jezgru i repliciranjem virusnog genoma, infekcija se smatra uspješnom. U posebnom poglavlju posvećenom Rab proteinima opisuje se koji su Rab proteini uključeni u unutarstanično putovanje adenovirusa i koja je uloga pojedinih Rab proteina u različitim fazama životnog ciklusa adenovirusa.

Rad je rađen u suradnji s Laboratorijem za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, koji se bavi istraživanjem biologije adenovirusa tipa 26, koji bi se mogao koristiti u vakcinaciji, ali i preusmjerenih adenovirusa tipa 5, koji bi se koristili u genskoj terapiji tumora.

## 2. ADENOVIRUSI

Adenovirusi (AdV) su DNA virusi koji pripadaju obitelji Adenoviridae, rodu Mastadenovirus, a prvi puta se spominju još 1953. godine kada su Rowe i suradnici pokušali dobiti adenoidno tkivo u laboratoriju te izolirali adenovirus iz tonzila odstranjenih kod djece, dok su Hilleman i Werner 1954. godine izolirali adenovirus iz sekreta gornjeg dišnog sustava (Rowe i sur., 1953; Hilleman i sur., 1954). Do sada je okarakterizirano 67 različitih humanih serotipa, koji su klasificirani u 7 podskupina od A-G (Huang i sur., 2013., Madisch i sur., 2005). Virusi unutar tih skupina razlikuju se po patologiji i molekularnim karakteristikama, npr. prema specifičnosti receptora i tropizmu stanice domaćina. (Stasiak i Stehle, 2020). S obzirom na tip AdV, infekcije određene skupine uzrokuju blage respiratorne, okularne i probavne bolesti kod ljudi (Majhen i sur., 2014; Ryu, 2017).

Zbog svoje visoke prevalencije kod ljudi, adenovirusi su dobro poznati, a najbolje je istražen tip AdV5 (Kojaoghlanian i sur., 2003). Najčešće adenovirusne infekcije kod ljudi uzrokuju adenovirusi iz skupina B, C i E, tipa AdV1, AdV2, AdV5 i AdV6. Svi tipovi koji mogu inficirati ljude navedeni su u **Tablici 1**. Zbog svoje visoke *in vitro* transdukcije, AdV5 (skupina C) koristi se kao adenoviralan vektor u raznim istraživanjima, ali glavno ograničenje ovog pristupa je da većina ljudske populacije već ima izraženu imunost na vektor AdV5 (seroprevalenciju) kao rezultat prirodne izloženosti. Već postojeći protuvektorski imunitet, koji kod ljudi iznosi od 50 do 90%, ovisno o određenoj geografskoj regiji, može znatno smanjiti uspješnost, kako vektora za prijenos gena, tako vektora namijenjenih cijepljenju. Upravo je zbog toga učinkovitost vektorskih cjepiva na bazi AdV5 ograničena, zbog čega se sve više koriste manje seroprevalentni tipovi kao što su AdV26 (skupina D) i AdV35 (skupina B) (Ewer i sur., 2016; HE i sur., 2012). Detaljnije o prednostima i ograničenjima uporabe adenoviralnih vektora u kliničkim primjenama bit će prezentirano u poglavlju: Primjena adenovirusa.

**Tablica 1.** Klasifikacija ljudskih adenovirusa i njihov tkivni tropizam (prilagođeno iz Robinson i Echavaria, 2007.)

<b>SKUPINA</b>	<b>TIP</b>	<b>TKIVNI TROPIZAM</b>
<i>A</i>	12, 18, 31	Probavni sustav
<i>B1</i>	3, 7, 16, 21, 50	Dišni sustav
<i>B2</i>	11, 14, 34, 35	Dišni i mokraćni sustav
<i>C</i>	1, 2, 5, 6	Dišni sustav
<i>D</i>	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54	Probavni sustav i oči
<i>E</i>	4	Dišni sustav
<i>F</i>	40, 41	Probavni sustav
<i>G</i>	52	Probavni sustav

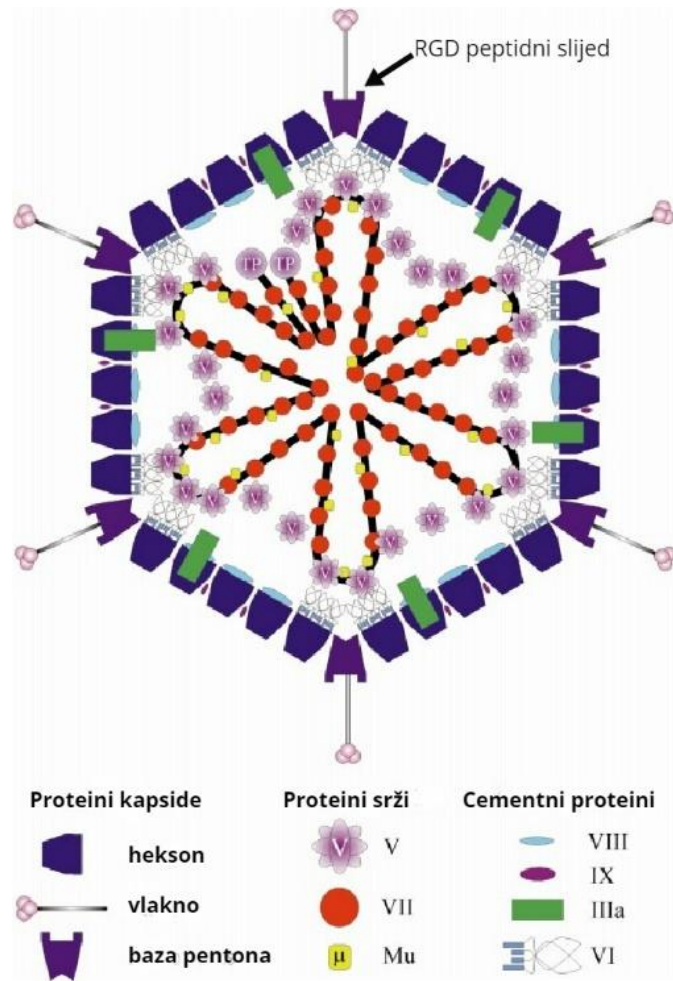
## 2.1. Struktura adenovirusa

Zbog svoje složene strukture tek su nedavno Liu i suradnici (2010. godine) uz pomoć krio-elektronske mikroskopije (krio-EM) rezolucije 3,6 Å, opisali cjelokupnu strukturu ljudskog adenovirusa (Liu i sur., 2010). Adenovirusi su virusi bez ovojnice, s ikozaedralnom kapsidom od otprilike 90 nm u kojoj se nalazi dvolančana DNA (Madisch i sur., 2005). Ikozaedralna kapsida sastavljena je od tri glavna proteina: heksona, baze pentona i vlakna (Stasiak i Stehle, 2020).

Najzastupljeniji strukturni protein (63% ukupne proteinske mase jedne virusne čestice) čini hekson (trimer polipeptida II) (van Oostrum i Burnett, 1985). Baza pentona i vlakno odgovorni su za interakciju sa stanicom domaćina i vezanje virusne čestice za receptor na staničnoj membrani. Vlakno se može podijeliti na tri domene: N-kraj (domena repa), kojim se vlakno nekovalentno veže za bazu pentona, središnji dio s varijabilnim brojem ponavljanja, koji utječe na duljinu vlakna i ovisi o serotipu AdV, te C-kraj (domena glave), koji posreduje u interakciji s različitim receptorima na staničnoj membrani. Vlakna su građena od trimera polipeptida IV, koji su učvršćeni na bazu pentona kapside (San Martín i Burnett, 2003).

Na bazi pentona nalazi se RGD peptidni slijed (Arg-Gly-Asp), koji je ključan u interakciji između adenovirusa s integrinima na površini stanice domaćina. Kako bi interakcija bila moguća, vlakno mora biti u prostorno povoljnom položaju te dovoljno dugačko kako bi se baza pentona mogla vezati s integrinima. Struktura adenovirusa prikazana je na **Slici 1**.





*Slika 1.* Strukutra adenovirusa (prilagođeno iz Russell, 2000).

Uz proteine kapside, virusnu česticu čine strukturni proteini V, VII, VIII, IX, Mu (X), VI i IIIa (**Tablica 2**). Proteini IIIa, VI, VIII, IX su četiri manja kapsidna proteina, koja služe za stabilizaciju kapside, sudjeluju u replikaciji virusa aktivirajući ekspresiju ostalih gena te imaju ulogu u ulasku virusa u stanicu domaćina, dok se proteini V, VII, Mu (X) nalaze u srži kapside i sudjeluju u interakciji s virusnom DNA te tako olakšavaju ulazak genoma u jezgru (Lion, 2014).

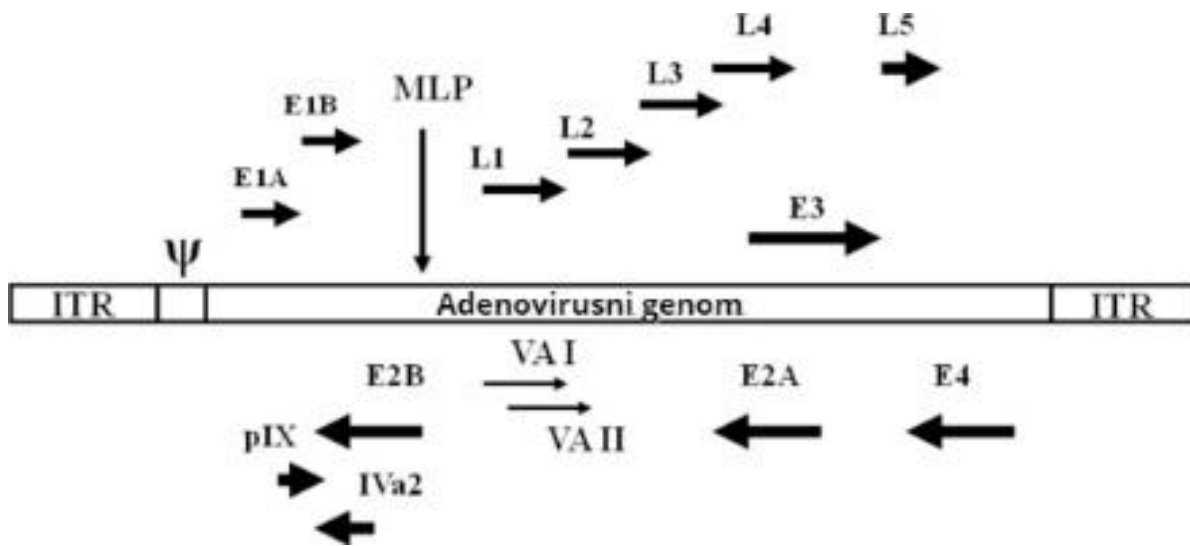
**Tablica 2.** Strukturni proteini adenovirusa (prilagođeno iz Majhen i sur., 2014.).

<b><i>AdV proteini</i></b>	<b>Broj čestica po virionu</b>	<b>Lokacija</b>
<i>Hekson (II)</i>	240 trimera	Kapsida
<i>Baza pentona (III)</i>	12 pentamera	Kapsida
<i>Vlakno (IV)</i>	12 trimera	Kapsida
<i>IIIa</i>	60	Kapsida
<i>VI</i>	340-360	Kapsida
<i>VIII</i>	120	Kapsida
<i>IX</i>	240	Kapsida
<i>V</i>	180	Srž
<i>VII</i>	800	Srž
<i>MU (X)</i>	100	Srž

## 2.2. Genom adenovirusa

Genom adenovirusa čini linearna dvolančana DNA molekula koja može biti i do 36 kB. Svaki kraj virusnog genoma sadrži obrnuto ponavljajuće sekvence (ITRs; engl. *Inverted Terminal Repeats*) duljine od 100 do 140 bp koje služe kao ishodište replikacije virusnog genoma (Majhen i sur., 2014). Kao i svi virusi, AdV za transkripciju i sintezu viralne mRNA koriste RNA-polimerazu II iz stanice domaćina (Kajon, 2019). Iako postoje male razlike između različitih AdV, cjelokupna organizacija genoma vrlo je slična i sastoji se od gena potrebnih za uspješnu replikaciju viralne DNA i strukturnih gena potrebnih za pravilno slaganje novonastalih virusnih čestica (Gallaher i Berk, 2013).

Genom adenovirusa možemo podijeliti na nekoliko regija, s obzirom na vrijeme kad se eksprimiraju pojedine regije (**Slika 2**). Razlikujemo ranu regiju genoma (E; engl. *Early*), srednju i kasnu (L; engl. *Late*). Prvi se prepisuju geni rane regije, koju čine geni E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4. Gen E1A potiče ekspresiju drugih virusnih gena, dok E1B gen kodira za jedan od dva E1B proteina, koji blokiraju apoptozu u adenovirusom zaraženim stanicama i zajedno sa E3 sudjeluje u suprimiranju aktivacije urođenog imunskog odgovora, čime je omogućena daljnja uspješna infekcija adenovirusa (Greber, 2020). E4 regija blokira staničnu mRNA uz istovremeni transport virusne mRNA iz jezgre u citoplazmu što dovodi do potpunog zaustavljanja sinteze proteina stanice domaćina (Kajon, 2019.). Srednju regiju genoma čine geni IX i IVa2, pri čemu je protein IX okarakteriziran kao važan strukturni proteini, ali i transkripcijski aktivator, dok protein IVa2 igra važnu ulogu u pakiranju viralne DNA (Parks, 2005; W. Zhang i sur., 2001). Proteini kasne regije zaduženi su za pravilno pakiranje virusnih čestica i omogućavanje izlaska virusne čestice. Kasna ekspresija započinje aktivacijom glavnog kasnog promotora MLP-a (MLP, engl. *Major Late Promoter*), koji generira pet populacija kasne mRNA, L1-L5. U istraživanju iz 2010. godine pokazano je da regije koje kodiraju proteine L4-22K i L4-33K u početku se eksprimiraju od promotora smještenog unutar L4 regije te s tim djeluju u potpunosti na aktiviranje MLP-a (Morris i sur., 2010).



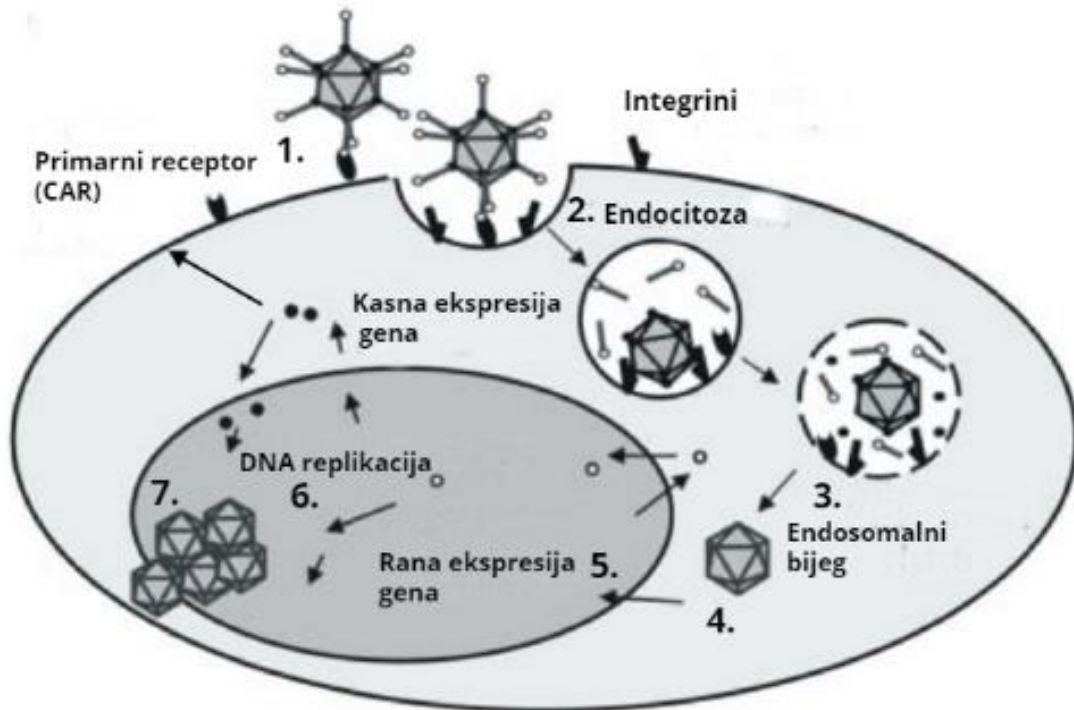
*Slika 2.* Prikaz genoma i transkripcije adenovirusa (Vetrini i Ng, 2010).

### 3. ŽIVOTNI CIKLUS ADENOVIRUSA

Životni ciklus adenovirusa sastoji se od nekoliko glavnih koraka (**Slika 3**):

1. Vežanje AdV za receptor na površini stanice.
2. Ulazak u stanicu određenim tipom endocitoze.
3. Izlazak ili "bijeg" iz endosoma.
4. Putovanje AdV kroz citoplazmu.
5. Ulazak adenovirusnog genoma u jezgru stanice domaćina.
6. Replikacija, transkripcija i translacija virusnog genoma i pakiranje novih virusnih čestica.
7. Izlazak novo upakiranih virusnih čestica iz stanice.

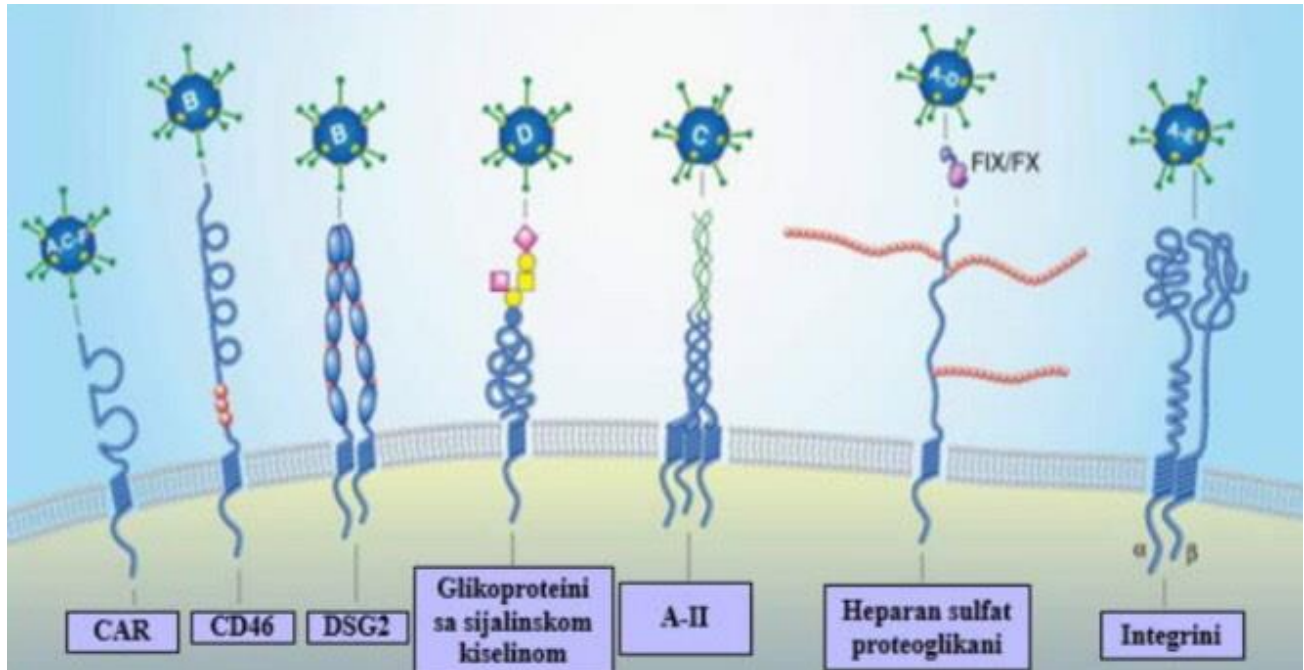
Ulazak adenovirusa u stanicu složen je proces, jer vežanje AdV za određeni stanični receptor određuje određeni endocitozni put, kojim virus ulazi u stanicu. Ovisno o serotipu, AdV se mogu vezati na različite receptore, što ukazuje na činjenicu da adenovirusi za ulazak u stanicu mogu koristiti više različitih načina. Nakon ulaska u stanicu, da bi se dogodila uspješna infekcija, adenovirus mora dostaviti svoj genom u jezgru stanice kako bi se eksprimirali virusni geni. S obzirom na to da je puno koraka uključeno u sam životni ciklus virusa, za uspješnu infekciju adenovirusima izuzetno je bitno da se unutarstanično putovanje virusa odvija brzo i efikasno, kako bi se izbjegla aktivacija urođenog imunskog odgovora unutar stanice. Zbog toga je suradnja adenovirusa sa staničnim proteinima i mehanizmima od izuzetne važnosti. Postoji nekoliko prepreka koji bi mogli onemogućiti uspješnu infekciju: a) koji tip endocitoze je pokrenut, b) hoće li virus uspješno "pobjeći" iz endosoma i izbjeći degradaciju u lizosomu, c) koje motorne proteine će koristiti za kretanje po mikrotubulima na svom putu do jezgre te d) hoće li se pravilno razmotati virusna kapsida kako bi viralna DNA bila uspješno dostavljena u jezgru. Neki od bitnih staničnih proteina koje AdV koriste za uspješnu infekciju su i Rab proteini. Detaljan pregled svakog od gore spomenutih koraka infekcije AdV opisan je u sljedećim poglavljima.



*Slika 3.* Infekcija stanice adenovirusom CAR (prilagođeno iz Kanerva i Hemminki, 2005).

### 3.1. Vežanje virusa na receptor stanice domaćina

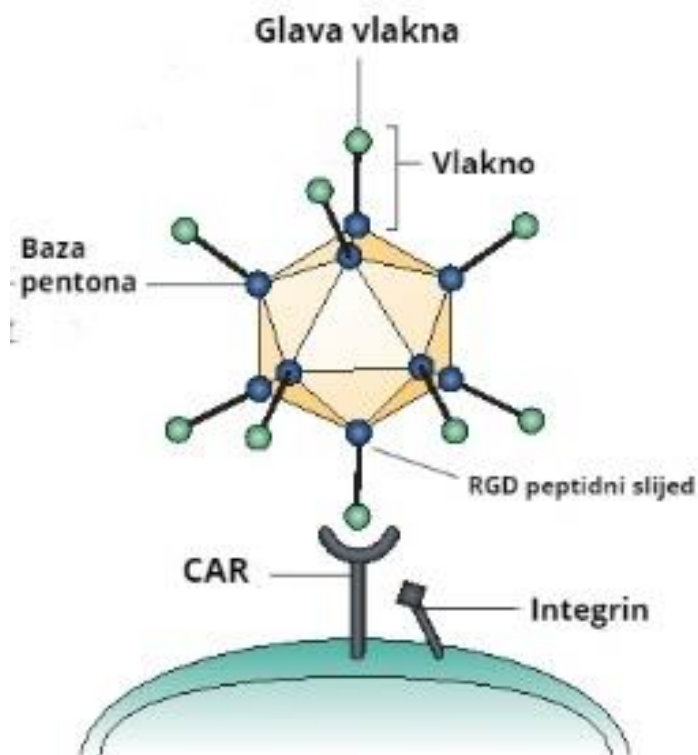
AdV se na stanični receptor vežu uz pomoć vlakna. Ovisno o serotipu AdV koriste čitav niz molekula prisutnih na površini stanice kao receptore za vežanje, odnosno posljedično za ulazak u ciljnu stanicu (**Slika 4**).



**Slika 4.** Prikaz receptora koje koriste adenovirusi (prilagođeno iz Arnberg, 2012).

Za većinu adenovirusnih serotipova (izuzev podskupine B) primarni receptor staničnog vežanja je CAR Coxsackie adenovirusni receptor (Roelvink i sur., 1998). CAR je transmembranski protein koji posreduje u adheziji stanica te je visoko izražen u stanicama pluća, bubrega, jetre ili miokarda. CAR sadrži dvije izvanstanične domene slične imunoglobulinu: CAR-D1 i CAR-D2 od kojih CAR-D1 ima izravan kontakt s vlaknom (Bewley i sur., 1999). Adenovirus se glavom vlakna veže za CAR receptor (**Slika 5**), nakon čega dolazi do savijanja vlakna i smanjenja udaljenosti između virusa i stanice, pri čemu RGD peptidni slijed iz baze pentona postaje dostupniji za vežanje na  $\alpha v$  integrine, koji u ovom slučaju predstavljaju koreceptore (Arnberg, 2012).

Integrini su heterodimeri koji se nalaze na površini stanice i služe kao receptori za proteine izvanstaničnog matriksa. Svaki integrin se sastoji od dvije transmembranske podjedinice,  $\alpha$  i  $\beta$ , koje se međusobno vežu u različitim kombinacijama i tvore 24 različita integrina. Interakcija adenovirusa s  $\alpha v$  integrinima potiče specifične signalne događaje koji omogućuju ulazak adenovirusa u stanicu endocitozom (Arnberg, 2012; Bewley i sur., 1999). Bitno je napomenuti da integrini nisu uvijek u ulozi koreceptora i da adenovirusi koriste više vrsta integrina kao svoje receptore što govori o njegovom širokom tropizmu (Wickham i sur., 1993). Većini CAR-negativnih stanica  $\alpha v \beta 5$  integrini predstavljaju primarni receptor (Lyle i McCormick, 2010), dok je studija (Nestić i sur., 2018) pokazala ključnu ulogu  $\alpha v \beta 3$  integrina u uspješnoj infekciji AdV tipa 26.



*Slika 5.* Vežanje adenovirusa za CAR receptor (engl. *Coxsackie adenovirusni receptor*) (prilagođeno iz Waehler i sur., 2007).

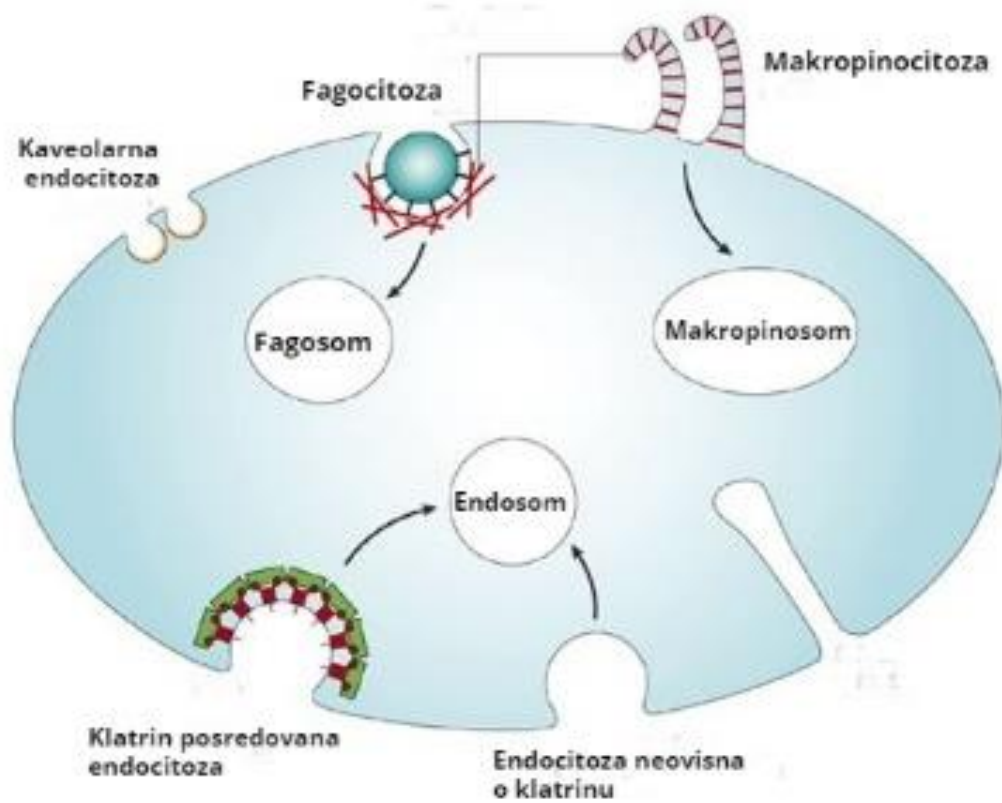


Što se tiče ostalih receptora za ulazak AdV u stanicu, AdV grupe B podijeljeni su u dvije podskupine B1 i B2, a svaka skupina veže se za različit glavni receptor. Članovi podskupine B1 (AdV11, AdV16, AdV21, AdV35 i AdV50) za vezanje koriste membranski kofaktor CD46 (Gaggar i sur., 2003), dok članovi podskupine B2 (AdV3, AdV7, AdV11 i AdV14) koriste molekulu desmoglein-2 (DSG2) kao primarni receptor (H. Wang i sur., 2008). Za adenoviruse iz skupne D zasad ima još vrlo malo podataka, no neka od dosadašnjih saznanja uključuju korištenje CAR, CD46 i sijalinsku kiselinu kao receptor (Li i sur., 2012). Ovisno o vrsti receptora koji je adenovirus koristio za vezanje na stanicu domaćina, započinje ulazak adenovirusa u stanicu putem receptor posredovane endocitoze.

### 3.2. Ulazak virusa u stanicu-Endocitoza

Endocitoza je stanični proces putem kojeg se izvanstanične molekule (hranidbene tvari, ligandi, bakterijski liposaharidi, hormoni, faktori rasta, protutijela, itd.) unose u stanicu. Razlikujemo nekoliko različitih tipova endocitoze (**Slika 6**), receptor-posredovanu (klatrinom i kaveolinom posredovana endocitoza) i receptor-neovisnu endocitozu (mikropinocitoza i fagocitoza). Ovisno o tvari koja je unesena u stanicu, endocitoza ima indirektnu ulogu u proliferaciji, rastu stanice, staničnom preživljavanju, aktivaciji imunskog odgovora, neurotransmisiji, embriogenezi, prijenosu signala za komunikaciju s okolišem, a u povijesti je imala važnu ulogu u endosimbiozi tijekom eukariotske evolucije, omogućujući temelje za nastanak određenih organela poput mitohondrija i plastida (Samaj i sur., 2005).

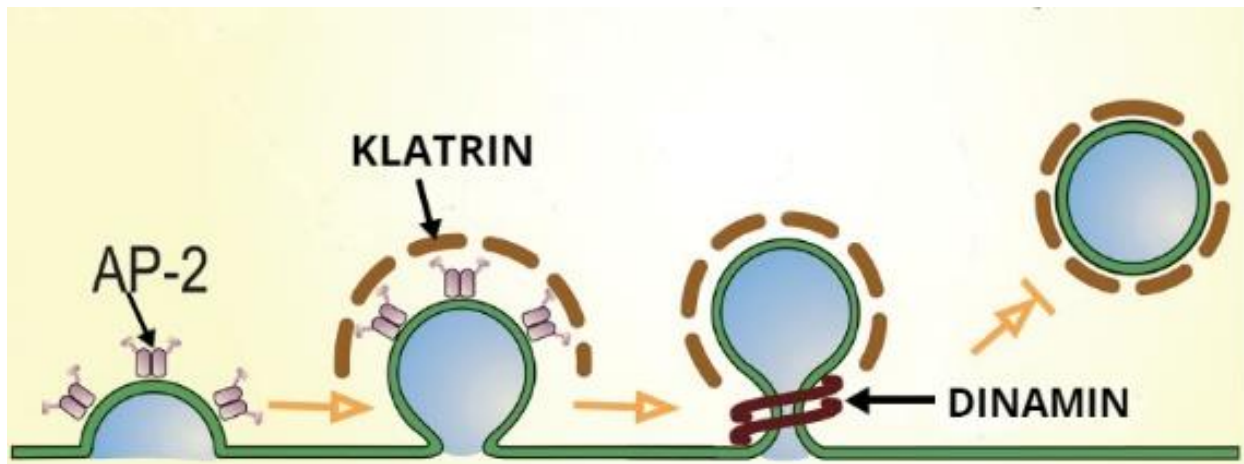
Za ulazak u stanicu, AdV najčešće koriste receptor posredovanu endocitozu i to specifično klatrin-ovisnu endocitozu (Zhao et al., 2019). Odmah poslije klatrin-ovisne endocitoze, AdV mogu ući u stanicu i posredstvom kaveolina, no postoje studije koje dokazuju da neki adenovirusi, kao što je slučaj s Ad35, ulaze u stanicu endocitozom neovisnom o receptorima, tzv. makropinocitozom (Kälin i sur., 2010). Također je poznato da AdV mogu aktivirati makropinocitozu i fagocitozu, koju u ovom slučaju ne koriste za internalizaciju, nego prvenstveno za bijeg iz endosoma (Meier i sur., 2002).



*Slika 6.* Endocitoza (prilagođeno iz Maxfield i McGraw, 2004).

### 3.2.1. Klatrinom posredovana endocitoza

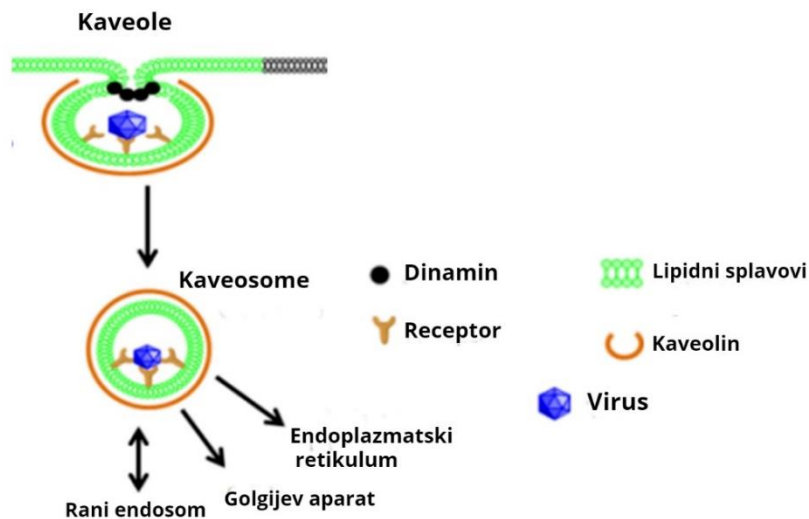
Klatrinom posredovana endocitoza najčešći je način ulaska adenovirusa u stanicu. Proces klatrinske endocitoze za razliku od ostalih endocitoznih puteva dobro je poznat te započinje vezanjem AdV za receptor (najčešće CAR) te invaginacijom membrane, uzrokovane akumulacijom integrina, nakon čega se počinje formirati vezikula (mjehurić), na koju se vežu proteini adaptorskog proteinskog kompleksa 2 (AP2). Na AP2 se zatim veže klatrin. Klatrin je protein u citoplazmi građen od heteroheksameta (tri teška i tri laka lanca koja formiraju triskelion) (Parton, 2016). Uz klatrin dodatno se još vežu i pomoćni citosolni proteini, koji pomažu u stvaranju klatrinom obavijenog mjehurića. Kad je mjehurić formiran, protein dinamin uz utrošak GTPaze odcjepljuje novonastalu vezikulu (endosom) od plazmatske membrane (**Slika 7**) nakon čega započinje odmatanje klatrina s mjehurića (Meier i Greber, 2003).



*Slika 7.* Klatrinom posredovana endocitoza (prilagođeno iz Daniel i sur., 2015).

### 3.2.2. Kaveolinom posredovana endocitoza

Kaveolinom posredovana endocitoza temelji se na proteinu kaveolinu (dimerni palmitilirani protein). Kaveole su invaginacije u plazmatskoj membrani koje nalikuju na bocu. Kaveolin se dijeli u tri pod skupine. Kaveolin-1, koji je najzastupljeniji te bez njega se kaveolarna endocitoza ne može odvijati, dok su kaveolin-2 i kaveolin-3 sporedni proteini i o njima ne ovisi kaveolarna endocitoza (Pelkmans i sur., 2001). Uz protein kaveolin koji je neophodan za stvaranje membranske invaginacije (kaveola), u signalni put stvaranja kaveolarnog “kaputa” uključeni su još kolesterol, sfingolipidi, signalni proteini i GPI-AP (glikozilfosfatidilinozitol siderin protein) te zbog njihove uključenosti kaveolarna endocitoza pripada podvrsti lipidnih splavova (**Slika 8**) (Samaj i sur., 2005). Iako kaveolinom posredovana endocitoza nije toliko dobro razjašnjena kao klatrinom ovisna endocitoza, Pelkmans i suradnici su 2002. otkrili kako je dinamin bitan u odcjepljivanju kaveole od plazmatske membrane (Pelkmans i sur., 2002).



**Slika 8.** Kaveolin posredovana endocitoza (prilagođeno iz Boisvert i Tjisse, 2012)

### 3.2.3. Makropinocitoza

Makropinocitoza je endocitozni put ovisan o aktinu i često potaknut faktorom rasta (Manzanares i Ceña, 2020). Makropinocitoza je važna za mnoge fiziološke procese zbog svoje neovisnosti o proteinima i lipidnim splavovima te mogućnosti stvaranja velikih vezikula preslagivanjem citoskeleta membrane. Ovim putem endocitoze omogućuje se ulazak česticama, koje ne bi mogle ući u stanicu drugim endocitoznim putevima. U aktivaciju makropinocitoze uključeni su integrini, aktin, trioizin-kinazni receptor, TIM/TAM skupina receptora te različiti stanični faktori, kao što je prikazano na **Slici 9** (Behzadi i sur., 2017). Adenovirusi makropinozitozu uglavnom ne koriste kao glavni endocitni put ulaska u stanicu, ali ju aktiviraju za potrebe pucanja endosoma, kako bi se osigurala uspješna infekcija (Meier i sur., 2002). Poznato je da AdV35 koristi makropinocitozu kao primarni put internalizacije u stanicu.



**Slika 9.** Makropinocitoza (prilagođeno iz Behzadi i sur., 2017).

#### **3.2.4. Fagocitoza**

Fagocitoza je specifični oblik endocitoze kojim stanice unose krute tvari, uključujući procese kojima se mikrobiološki patogeni neutraliziraju opsonizacijom (Bidgood i sur., 2014). Kao i u slučaju makropinocitoze, AdV mogu aktivirati fagocitozu, ali ju ne koriste kao primaran endosomalni put. Čestice adenovirusa u klatrinskom omotaču mogu potaknuti signale koji pokreću fagosomsku lizu. Fagosomska liza pomoću Ad-CARex-Fc neovisna je o *av* integrinima te imunoglobulini koji oblažu adenovirus potiču fagocitozu interakcijom s Fc-receptorima, koji se signaliziraju uz pomoć G proteina Rac i Cdc42, te fosfatidilinozitol-3-kinazom i protein kinazom C (May i Machesky, 2001). Mercier i suradnici su 2004. pokazali da AdV5 čestice mogu biti internalizirane putem FcyR2 i FcyR3 receptora u dendritičke stanice (Mercier i sur., 2004).

### 3.3. Izlazak virusa (bijeg) iz endosoma i putovanje kroz citoplazmu

Nakon što je virus ušao u stanicu u obliku vezikule (klatrinske ili kaveole), tzv. endosoma, za daljnji nastavak unutarstaničnog putovanja potrebno je da se endosom odvoji od plazmatske membrane. Kao što je objašnjeno u prethodnom poglavlju o endocitozi, protein dinamin zaslužan je za odcjepljenje endosoma od plazmatske membrane i kod klatrin ovisne endocitoze i kod kaveolarne endocitoze. Nakon što se endosom u kojem se nalazi virus odvoji od membrane, započinje proces zakiseljavanja unutrašnjosti endosomskog mjehurića, do pH vrijednosti 5-6 (Boisvert i Tijssse, 2012; Perez i Carrasco, 1994). Zakiseljavanje unutrašnjosti endosoma uzrokuje strukturne promjene u adenovirusnoj čestici, zbog čega dolazi do oslobađanja adenoviralnog proteina VI iz kapside AdV, membrana endosoma puca i adenovirusna čestica izlazi iz endosoma (Perez i Carrasco, 1994). Izlazak adenovirusa, tzv. "bijeg" iz endosoma jedan je od ključnih koraka u adenovirusnoj infekciji, upravo kako bi izbjegao razgradnju u lizosomu. Iako postoji malo podataka o ovom ključnom trenutku, poznato je da AdV2 i AdV5 pronalaze bijeg iz endosoma vrlo brzo nakon odvajanja endosoma od plazmatske membrane (Greber i sur., 1993).

Kasnije je otkriveno kako su uz lizosomotropne agense (molekule koje su predodređene za odlazak u lizosome) i kiseli pH za uspješno oslobađanje AdV iz endosoma potrebni dodatni čimbenici (Perez i Carrasco, 1994; Rodríguez i Everitt, 1996). Jedan od čimbenika je integrin  $\alpha\beta5$ , što pokazuje široku ulogu integrina u uspješnoj infekciji adenovirusa.

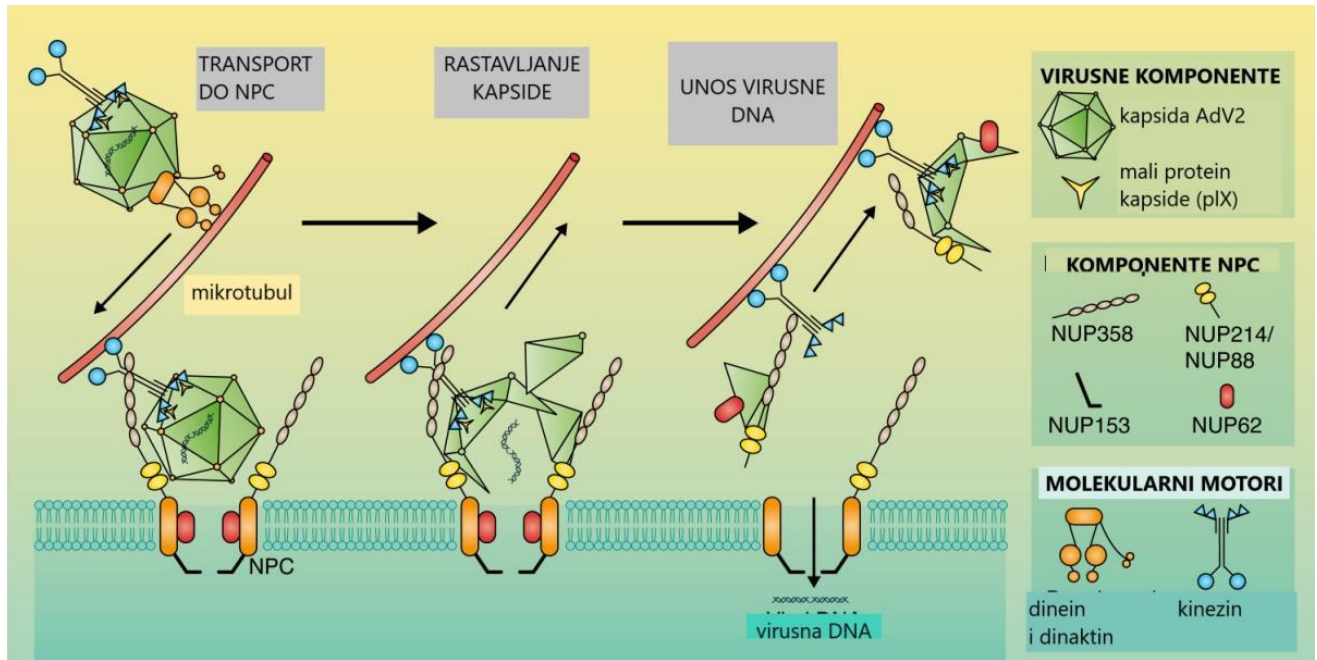
Oba tipa integrina, i  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  potpomažu u početnim procesima internalizacije virusa, ali  $\alpha\beta5$  igra i važnu ulogu u permeabilizaciji endosomalne membrane i pucanje endosalnog mjehurica, čime se olakšava bijeg adenovirusa (K. Wang i sur., 2000). Spajanjem adenovirusne baze pentona s integrinom  $\alpha\beta5$ , aktivira se viralno-kodirajuća cistein proteaza, odgovorna za rupturu endosomalne membrane. Nakon uspješnog bijega, adenovirusna čestica se nalazi u viskoznom citosolu i veže se za motorne proteine te mikrotubulima putuje do jezgre (Greber i sur., 1997). Vezanje adenovirusa za motorne proteina utječe na brzinu puta, iz razloga što put može biti dvosmjernan ili jednosmjernan, ovisno veže li se adenovirus za protein dinein ili kinezin (Scherer i Vallee, 2011).



### 3.4. Ulazak adenovirusnog genoma u jezgru stanice domaćina

Adenovirusna čestica putuje prema svom konačnom cilju, jezgri, u koju treba unijeti svoju DNA. Mehanizam ulaska adenovirusne DNA u jezgru stanice nije u potpunosti razjašnjen, no podaci iz literature spominju nekoliko proteina koji bi mogli biti uključeni: protein jezgrine pore (NPC; engl. *Nuclear Pore Complex*) CAN/Nup214, Hsc70 i CRM1 (Curiel, 2016). Nadalje, istraživanje Bauer i sur. (2019) uspijeva djelomično rasvijetliti mehanizam dostave adenovirusnog genoma u jezgru stanice i karakterizira enzim E3 ubikvitin ligazu Mind bomb 1 (Mib-1) kao ključnu za ovaj događaj (Bauer i sur., 2019). Također, navode da je ključan događaj za uspješnu dostavu genoma pravilno odmatanje kapside, koja nakon što genom uđe u jezgru, ostane u citoplazmi prikazano na **Slici 10**.

Adenovirusna DNA ulazi u jezgru kroz kompleks jezgrinih pora. Geni rane faze omogućuju inhibiciju, ulazak stanice domaćina u S fazu staničnog ciklusa te stvaranje produkata potrebnih za DNA replikaciju viralnog genoma. Adenovirusna transkripcija pripada ranoj fazi koja započinje ranom regijom E1A koja zatim omogućuje transkripciju ostalih regija E1B do E4 (Kelkar i sur., 2004). Na linearnoj dvostrukoj uzvojnici započinje sinteza virusne DNA. Replikacijom adenovirusne DNA započinje kasna faza koja se aktivira MLP-om te selektivnim transportom i translacijom adenovirusnih mRNA. Za replikaciju su potrebna tri virusna proteina kodirana E2 genima (pTP, AdV DNA polimeraza i protein koji veže DNA) i dva stanična transkripcijska faktora (NFI i Oct-1). L1-L5 geni aktiviraju se na kraju replikacije adenovirusa stvarajući oko 20 adenovirusnih mRNA. U citoplazmi se odvija sinteza proteina kapside dok se u jezgri odvija sazrijevanje virusne čestice aktivacijom L3 proteaze koja djeluje ujedno i na kaskadu proteolitičkih aktivnosti i formiranja zrele adenovirusne čestice (Shenk, 2001.).

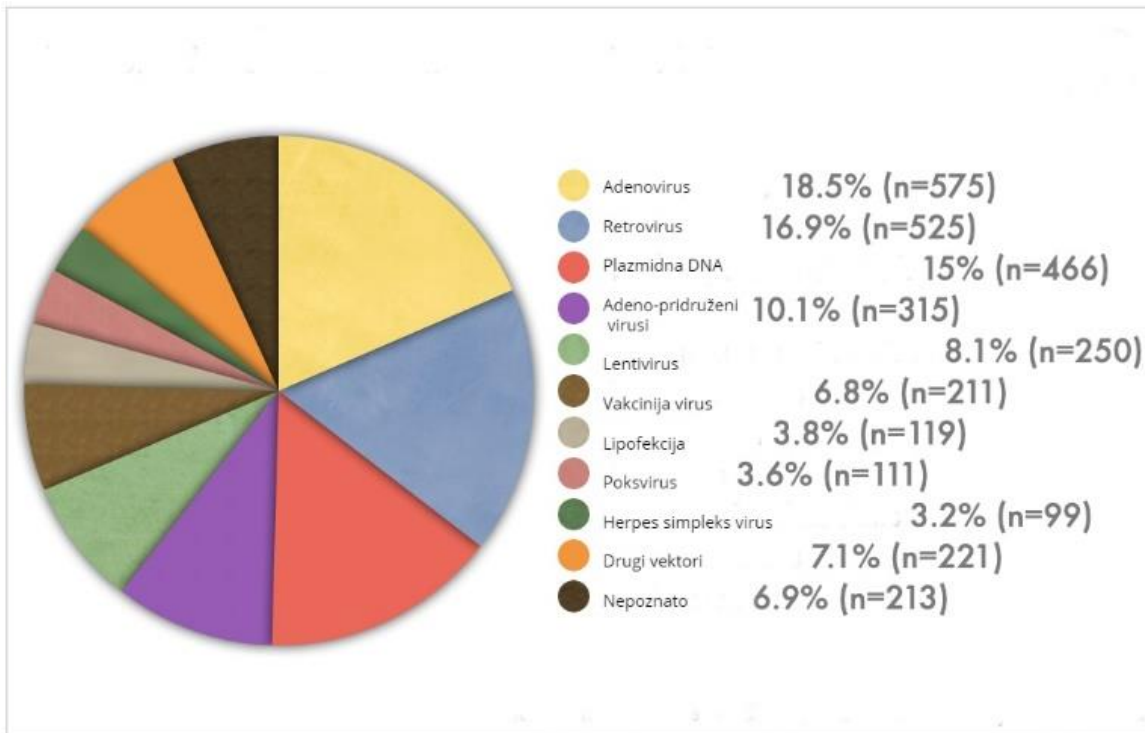


**Slika 10.** Ulazak adenovirusa u jezgru (prilagođeno iz Yamauchi i Helenius, 2013)

## 4. PRIMJENA ADENOVIRUSA U GENSKOJ TERAPIJI

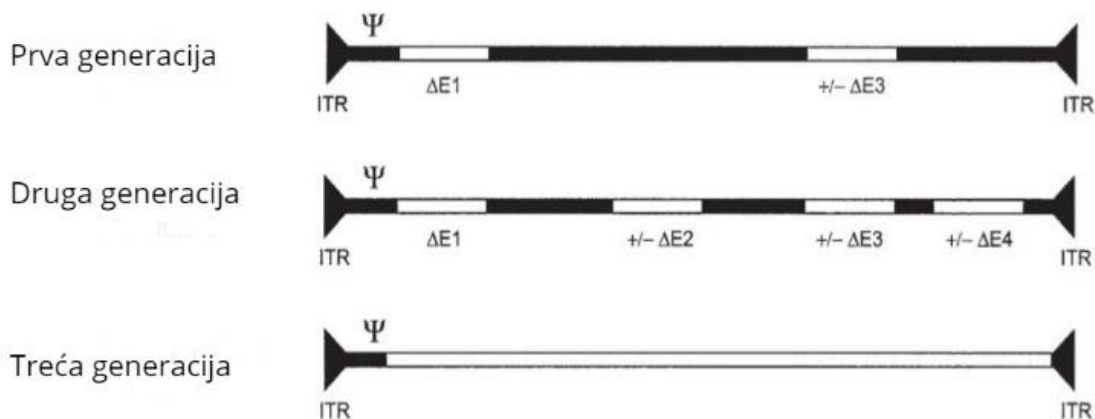
### 4.1. Adenoviralni vektori

Zadnjih desetljeća uz napredak molekularne biologije te razvojem molekularnih metoda manipulacije virusnog genoma, adenovirusi su potvrđeni kao izvrsni kandidati za razvoj vektora namijenjenih prijenosu gena, genskoj terapiji različitih bolesti i tumora te razvitku vakcina. Kako bi se adenovirusi koristili kao sigurni vektori, potrebno je prvobitno ukloniti dijelove genoma odgovorne za replikaciju virusa te omogućiti ugradnju stranog genetskog materijala. Uklanjanjem E1A regije viralnog genoma, odgovorne za aktivaciju replikacije adenovirusa, dobivaju se replikativno defektni vektori, kojima je onemogućena ekspresija ranih i kasnih viralnih gena, ali i povećan kapacitet za ugradnju transgena. Osim E1A regije, E3 regija virusnog genoma također se uklanja prilikom konstruiranja viralnih vektora, čime se dodatno povećava kapacitet za ugradnju transgena i time omogućuje ugradnja gena do veličine 8.2 kb. Zbog svoje lake mogućnosti umnažanja, mogućnosti ugradnje strane DNA, pročišćavanja te odsustva štetnog učinka na ljude, adenoviralni vektori pronašli su svoju široku primjenu (Hendrix, 1999). Adenovirusni vektori su najčešće korišteni vektori u kliničkim ispitivanjima genske terapije, kao što je to prikazano na **Slici 11**. Raznim kliničkim ispitivanjima kroz niz godina te unaprjeđenjem tehnika konstruirani su adenovektori druge i treće generacije (**Slika 12**).



**Slika 11.** Korišteni vektori u kliničkim ispitivanjima u genskoj terapiji 2019 godine (prilagođeno iz <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>)

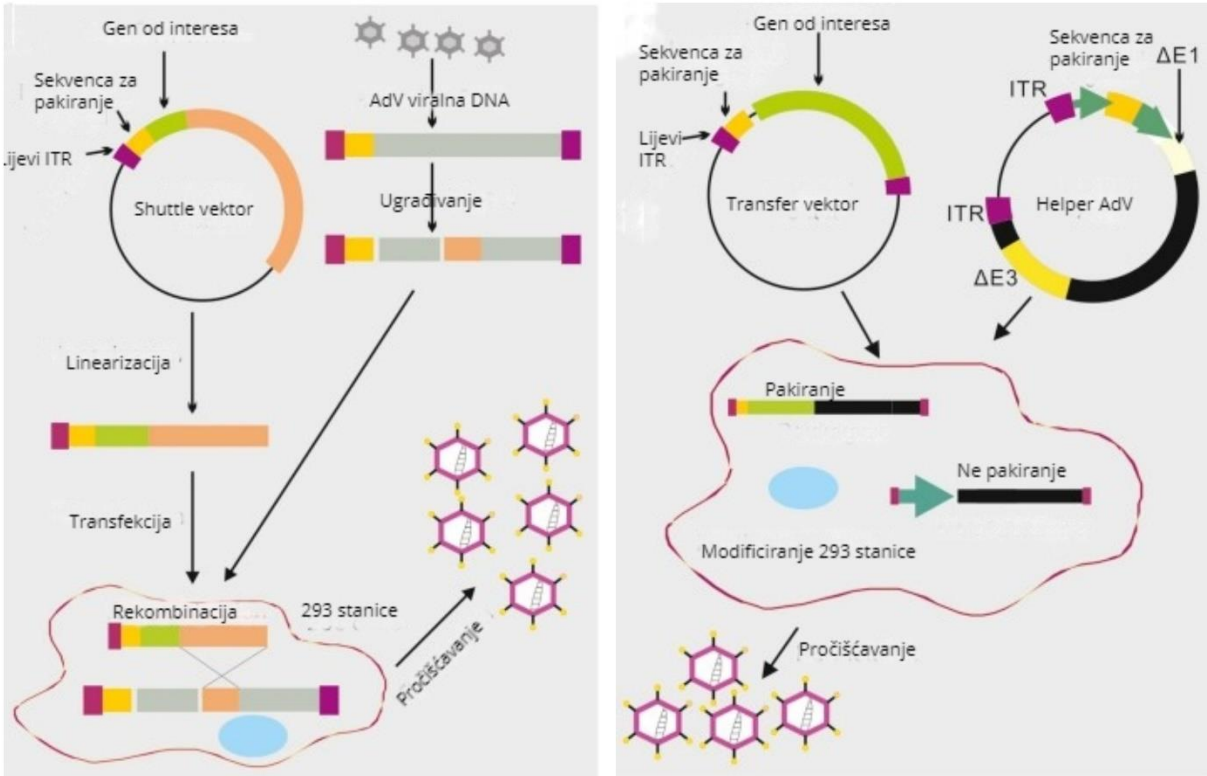
U prvoj generaciji virusnih vektora omogućena je ugradnja strane DNA od 5-6 kb te stavljanje transgena pod kontrolu heterolognog promotora delecijom E1 uz mogućnost delecije i E3 područja. Navedenom delecijom spriječila se replikacija adenovirusa u stanici bez negativnog utjecaja na prijenos gena. Takvi replikativno defektni vektori mogu se namnažati jedino u stanicama koje imaju stabilnu ekspresiju gena E1A, kao što su HEK293a stanice (Graham i sur., 1977; McConnell i Imperiale, 2004). Iako su prvi rezultati bili zadovoljavajući, s vremenom je dokazana kratkotrajna ekspresija transgena, najvjerojatnije zbog povećanog imunskog odgovora domaćina na česticu vektora.



**Slika 12.** Genomska struktura prve, druge i treće generacije virusnih vektora (prilagođeno iz McConnell i Imperiale, 2004).

Druga generacija virusnih vektora osim delecije E1 i E3, imala je deleciju E2 područja, no pitanje imunosnog odgovora i dalje se nije riješilo što je dovelo do proizvodnje treće generacije virusnih vektora (McConnell i Imperiale, 2004). Treća generacija uključuje deleciju svih virusnih gena izuzev ITR te također zahtijevaju pomoćne (engl. *helper*) viruse ili plazmide kako bi se mogli umnožiti. Iako ne izazivaju jak imunološki odgovor te omogućavaju trajnu ekspresiju gena i ugradnju strane DNA do 37 kb, zahtijevaju pažljivo pročišćavanje, a prisustvo pomoćnog virusa može povećati nestabilnost vektora (Hardy i sur., 1997).

Umnažanje adenovirusnih vektora uključuje korištenje konstrukta, pomoćnog/pomoćnih plazmida za pakiranje i komplementirajućih stanica HEK293 (**Slika 13**).



**Slika 13.** Primjeri pristupa u umnažanju adenoviralnih vektora uz pomoć plazmida za pakiranje i komplementorajućih stanica HEK293. Obrisane sekvence genoma divljeg tipa označane su kao  $\Delta E1$  i  $\Delta E3$ , ITR – obrnute terminalne sekvence (prilagođeno iz Lee i sur., 2017).

## 4.2. Genska terapija

Adenovirusi se zbog svojeg prirodnog tropizma prema respiratornom sustavu smatraju idealnim kandidatima za korištenje u genskoj terapiji kod određenih respiratornih bolesti, kao što su cistična fibroza (CF). U istraživanju iz 1991. Rosenfeld i suradnici dokazali su uz pomoć modela miša, da adenovirusi mogu biti učinkoviti sustav dobivanja ekspresije željenih gena u svim epitelnim stanicama respiratornog sustava (Rosenfeld i sur., 1991). Adenovirusni vektori smatraju se također mogućim kandidatima u genskoj terapiji kod moždanih oboljenja.

U nekoliko studija pokazalo se kako adenovirusi mogu *in vivo* zaraziti i razne moždane stanice kao što su neuroni, oligoendociti (Kozarsky i Wilson, 1993). Kad govorimo o onkolitičkim vektorima, izuzetno je bitno da takvi vektori specifično ciljaju stanice tumora i da se u istima efikasno propagiraju. Tumori gušterače predstavljaju znatan klinički problem, s obzirom na činjenicu da se takvi karcinomi najčešće kasno dijagnosticiraju, što rezultira izrazito niskim petogodišnjim preživljenjem od samo 9% (National Cancer Institute, USA, <https://www.cancer.gov/types/pancreatic>, pristupljeno 18. rujna 2020). Današnji oblici kemoterapije često stvaraju probleme u liječenju pacijenata stoga što su nuspojave izrazito teške i često bivaju oštećene i zdrave stanice i tkiva. Stoga se kontinuirano traže efikasniji pristupi liječenju tumora, u kojem bi se ciljale isključivo tumorske stanice specifične za određeni karcinom, čime bi se poštedjelo zdravo tkivo, smanjile toksične nuspojave liječenja te u najboljem slučaju, produžilo petogodišnje preživljenje oboljelih.

Jedan od takvih pristupa je upotreba onkolitičkih adenovirusa, koji bi ciljali isključivo stanice odgovorne za nastanak specifičnog tipa raka gušterače i uzrokovale lizu specifičnih stanica raka. 2017. godine Yamamoto i suradnici pokazali su da se adenoviralni vektor AdSur-SYE (engl. *survivin promoter-regulated adenovirus, displaying the SYE ligand*), koji je reguliran pomoću survivinskog promotora i koji eksprimira ligand SYENFSA (specifično cilja karcinome gušterače), može koristiti kod bolesnika s neuroendokrinim karcinomom gušterače (PNET, engl. *Pancreatic Neuroendocrine tumor*) kao i duktalnim adenokarcinomom gušterače (PDAC, engl. *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*).

Adenovirusni rekombinantni vektor, koji kodira ligand SYE pokazao je znatno veću učinkovitost transdukcije gena u PNET-u kao i PDAC stanicama u usporedbi s neciljanim vektorom, tzv. praznim vektorom (AdSur). Visoka infektivnost onkolitičkog adenovirusa koji eksprimira SYE ligand dovela je do snažnog antitumorskog djelovanja u PNET staničnim linijama mišjeg modela te kliničkim uzorcima u usporedbi s neciljanim vektorom AdSur-om (Yamamoto i sur., 2017). Osim u efikasnoj lizi stanica primarnog raka, onkolitički vektori mogu se upotrebljavati i za liječenje metastatskih tumora, koji su rašireni po tijelu oboljelih.

Većina smrtnih slučajeva malignih oboljenja, njih čak 90% otpada na metastatska oboljenja koja su se proširila s primarnog mjesta na druge dijelove tijela (Emdad i sur., 2018). Adenovirusna genska terapija može se upravo koristiti i u takvim kliničkim slučajevima. Emdad i suradnici su 2018. novom strategijom ultrazvučnog ciljanog uništavanja mikro mjehurića (UTMD, engl. *Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction*) prikazali novi pristup koji ima obećavajući učinak kod terapije primarnih i diseminiranih tumora. Korišteni su modificirani adenovirusi tipa 3 i 5, koji se selektivno repliciraju u stanicama raka, istodobno stvarajući toksične citokine protiv raka. Kapsuliranjem virusa u mikro mjehuriće omogućuju tzv. "stelt isporuku" tumorskim stanicama, koje pod utjecajem fokusiranog ultrazvuka uzrokuju oslobađanje virusa, koji posljedično ubijaju tumorske stanice. Nadalje, počinju se lučiti MDA-7 / IL-24 molekule, koje stimuliraju imunološki sustav da napada udaljene karcinome, inhibira angiogenezu tumora i izravno potiče apoptozu u udaljenim stanicama raka (Emdad i sur., 2018).

Adenovirusni vektori danas se koriste u kliničkim ispitivanjima malignih oboljenja uključujući rak prostate, hepatocelularnog karcinoma, metastatskog raka dojke i mnogih drugih oboljenja kao što je vidljivo u bazi podataka NIH (National Institute of Health, USA) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=adenoviral+vector&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>, pristupljeno 18. rujna 2020). Rak prostate jedan je od najčešćih tumora kod muškaraca. Tamura i suradnici (2018.) razvili su adenovirusne vektore čijom se ekspresijom transgena kontrolira promotor koji reagira na p53 gen (tumor supresorski gen). Čime se stvara mehanizam pozitivne povratne sprege koji se koristi za pokretanje ekspresije p53 gena.



Iako se ovaj pristup pokazao učinkovitiji od upotrebe tradicionalnih inačica Ad-p53 u ubijanju staničnih linija raka prostate i inhibiranju napredovanja tumora ne očekuje se da će genska terapija zamijeniti tradicionalnu kemoterapiju nego da se kombinacija genske terapije i kemoterapije može pokazati ključnom za uspjeh oba pristupa (Tamura i sur., 2018). Slično radi i prvi odobreno genski lijek Gendicin. Naime, u Narodnoj Republici Kini je Gendicine odobren kao lijek na bazi adenoviralnog vektora za unos divljeg tipa gena TP53 (Ad5RSV-p53). Radi se o rekombinantnom humanom p53 adenovirusu serotipa 5 za liječenje tumora glave i vrata koji je već 12 godina u kliničkoj praksi i testiran je na više od 30000 pacijenata zasebno ili u kombinaciji s kemoterapijom ili radioterapijom. U publiciranim kliničkim studijama, učinkovitost Gendicina pokazana je u liječenju karcinoma primjenom intratumoralnim injekcijama kao i primjenom unutar usne šupljine. Pojačani učinak sistemske kemoterapije postignut je uz kombiniranu primjenu intraarterijskom injekcijom ili intravenskom infuzijom Gendicina i kemoterapeutika (W. W. Zhang i sur., 2018).

Prevenција raka jednako je važna i jednako vrijedna kao i liječenje raka. Nedavna pretklinička ispitivanja na životinjskom modelu raka gušterače izvijestila su da je potaknutom mutacijom u TAD2 regiji p53 rezultirao snažnijom supresijom raka gušterače. Dostava gena visoke učinkovitosti p53 i visoka ekspresija proteina p53 u stanicama može omogućiti Gendicinu da igra ulogu u prevenciji raka gušterače. Još jedno područje važno za prevenciju raka je razvoj cjepiva, posebno oralnog cjepiva, koje se može uključiti u sheme aplikacije Gendicina u svrhu profilakse odnosno prevencije raka. Ovaj se aspekt međutim, mora dodatno istražiti (W. W. Zhang i sur., 2018).

### 4.3. Cjepivo

Adenovirusni vektori danas se široko koriste u cjepivima. Milijuni vojnika imunizirani su protiv akutnih gastrointestinalnih i respiratornih bolesti uzimanjem cjepiva u obliku enterički obloženih kapsula AdV4 i AdV7 (Deal i sur., 2013). Uz pomoć replikacijski defektnih AdV5 vektora, Safronetz i suradnici uspjeli su potaknuti imunološki odgovor kod hrčaka i miševa inficiranih smrtonosnim hantavirusom, dok su Cox i suradnici konstruirali cjepivo na bazi Ad2V6 kako bi zaustavili širenje Zika virusa u Brazilu 2015. godine (Safronetz i sur., 2009; Cox i sur., 2018). Također se istražuju cjepiva na bazi adenovirusa u borbi protiv različitih bakterijskih patogena kao što su *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* i *Clostridium difficile* (Majhen i sur., 2014).

Trenutna pandemija COVID-19, koja uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom, istaknula je potrebu za učinkovitim preventivnim rješenjima širenja bolesti, koja je do sada prouzročila više od 29 milijuna slučajeva širom svijeta te se svakodnevno prijavljuje veliki broj slučajeva iz Europe, SAD-a, Brazila, Rusije, Indije i mnogih drugih zemalja (World health organization, UN, <https://www.who.int/>, pristupljeno 19. rujna 2020 ).

U utrci za pronalaskom rješenja, adenovirusni vektori pokazali su se kao izvrsni kandidati. Zhu i suradnici 2020. proveli su randomizirano kontrolirano ispitivanje za cjepivo COVID-19 na dvije skupine uključujući injekcije s vektorom AdV5 od  $1 \times 10^{11}$  i  $5 \times 10^{10}$  virusnih čestica. Jedna imunizacija COVID-19 cjepivom s vektorom AdV5 na virusnim česticama  $5 \times 10^{10}$  pokazala je dobar sigurnosni profil i značajan specifični imunološki odgovori na SARS-CoV-2, čineći ga potencijalnim kandidatom u slučaju hitnog cijepljena (Zhu et al., 2020).

Logunov i suradnici 2020. ispitivali su heterologno cjepivo temeljeno na adenovirusnom vektoru protiv SARS-CoV-2. Cjepivo uključuje dva rekombinantna adenovirusna vektora rAd26 i rAd5 te je razvijeno u dvije formulacije: smrznuto (Gam-COVID-Vac) i liofilizirano (Gam-COVID-Vac-Lyo). Studija je uključivala dvije skupine sudionika. Obje formulacije cjepiva bile su sigurne i dobro podnesene te su svi sudionici proizveli antitijela na glikoprotein SARS-CoV-2, no potrebna su dodatna ispitivanja kako bi cjepivo prošlo sve kliničke faze ispitivanja.

Heterologno cjepivo COVID-19 na osnovi adenovirusnih vektora pokazalo je dobar sigurnosni profil te uzrokovalo snažan humoralni i stanični imunološki odgovor (Logunov i sur., 2020). Iako postoje naznake o uskoro mogućem cjepivu kao rješenju trenutne situacije, potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se sa sigurnošću moglo prevenirati COVID-19.

## 5. ULOGA RAB PROTEINA U INFEKCIJI ADENOVIRUSA

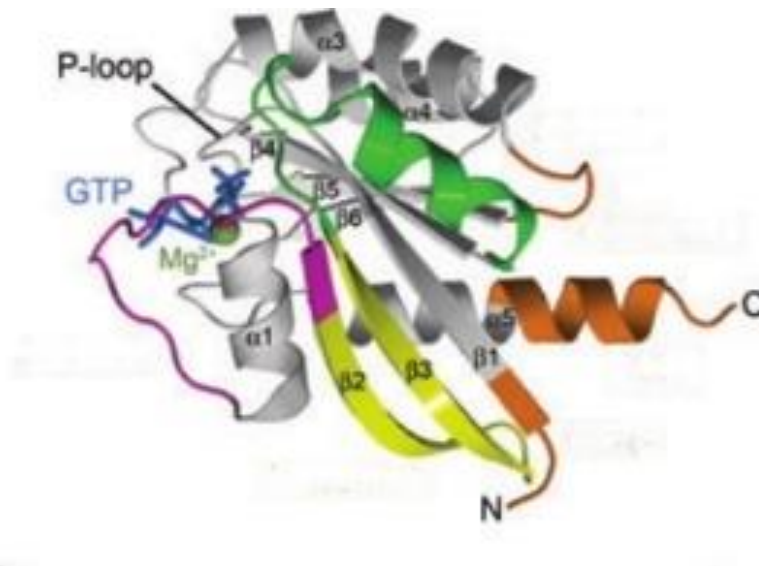
Rab proteini pripadaju porodici malih (21-25 kDa) monomernih GTPaza i podskupini superobitelji Ras GTPaza. Male GTPaze ili mali G-proteini pripadaju porodici enzima hidrolaze, koja veže hidrolizirani gvanozin trifosfat (GTP). Male GTPaze mogu neovisno hidrolizirati GTP da bi se stvorile gvanozin difosfat (GDP) (Stenmark i Olkkonen, 2001). Podskupine Ras GTPaza (Ras, Rab, Rho, Ran i Arf GTPaze) pokrivaju široki spektar procesa kao što su reakcije na vanjske podražaje, unutrašnji transport i preoblikovanje citoskeleta. Različite Rab GTPaze nalaze se na citosolnoj površini unutarstaničnih membrane, gdje djeluju kao glavni regulatori u različitim unutarstaničnim putevima (Brighouse i sur., 2010).

### 5.1. Struktura Rab proteina

Strukturne informacije visoke rezolucije o građi nekoliko Rab proteina dobivene su rendgenskom kristalografijom (Eathiraj i sur., 2005). Do danas je dostupna struktura najmanje 16 Rab proteina u GTP vezanoj konformaciji i oko 17 u GDP vezanoj s čime se omogućilo određeno saznanje i uvid u strukturnu organizaciju Rab proteina (Gabe Lee i sur., 2009). Tercijarna struktura Rab proteina sastoji se od središnjeg dijela sastavljenog od šest  $\beta$ -listova okruženih s pet  $\alpha$ -spiralama te je vrlo slična ostalim porodicama iz obitelji Ras, kao što se vidi na **Slici 14** (Stenmark i Olkkonen, 2001).

Područje  $\alpha 1$  je strogo konzervirano među svim GTPazama, koje uključuje kofaktor za vezivanje i hidrolizu nukleotida, element za vezanje  $Mg^{2+}$  i GTP-vezujuću platformu, potrebne za funkcionalnost proteina. Raznim istraživanjima definirane su dvije regije koje se nalaze između petlje  $\alpha 1/\beta 2$  i petlje  $\beta 3/\beta 4$  te su nazvane prekidač I i II. Prekidači I i II daju funkcionalnu specifičnost Rab proteinima, jer pokazuju konformacijske razlike između aktivnog i neaktivnog stanja, dok C-terminalna domena (hipervarijabilna domena) pokazuje najveću evolucijsku raznolikost s obzirom na aminokiselinske sekvence proteina Rab.

C-terminalna domena najčešće završava s Rab-CXC (C-cistein, X-aminokiselina), a potrebna je za posttranslacijsku modifikaciju, dodavanjem dvaju geranilgeranil (20 atoma ugljika) izoprenoida na C-terminalne cysteine, omogućujući povezivanje određenih Rab proteina sa staničnom membranom uz katalizator reakcije geranilgeraniltransferazu II (RGGT)(Vázquez-Martínez i xMalagón, 2010).



**Slika 14.** Općenita struktura Rab proteina. P-loop – mjesto vezanja fosfatne skupine GTP molekule. Prikazane su i alfa i beta ploče proteina te označeni C i N terminalni krajevi molekule (prilagođeno iz Gabe Lee i sur., 2009).

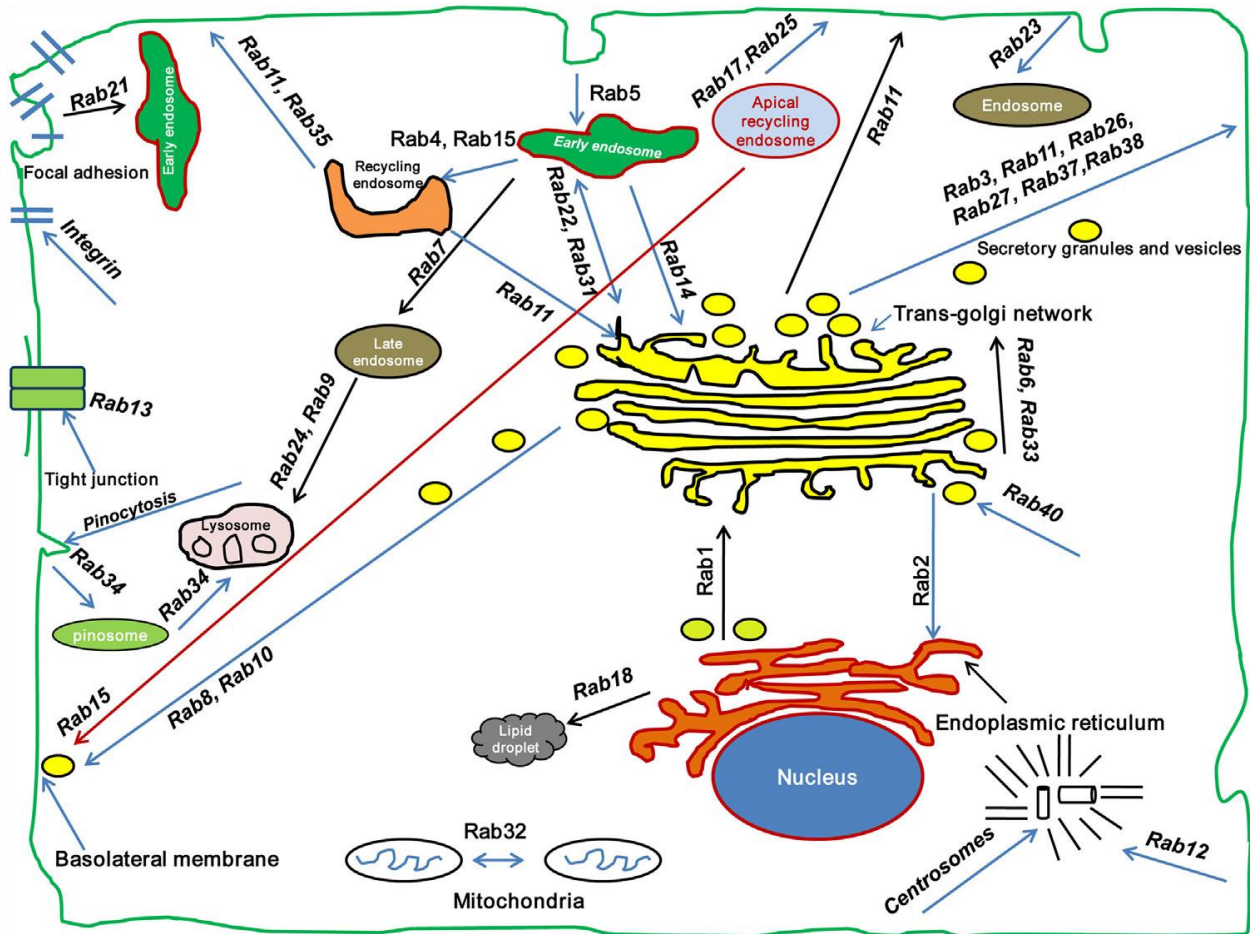
## 5.2. Obitelj Rab proteina

Rab obitelj proteina evolucijski je očuvana te pronađena u populaciji od kvasca pa sve do čovjeka, što ukazuje na iznimnu važnost ove obitelji proteina. Devedesetih godina prošlog stoljeća prvi puta se rasvjetljava funkcija Rab proteina. Prilikom istraživanja endocitnog puta, Rab5 i Rab 7 bili su prvi lokalizirani Rab proteini (Chavrier i sur., 1990). Od tada pa sve do danas, otkriveno je da gotovo  $\frac{3}{4}$  Rab proteina ima ulogu u nekom dijelu endocitoze (**Slika 15, Tablica 3**). Rab obitelj proteina obuhvaća oko 70 članova te se smatraju glavnim regulatorima unutarstaničnog transporta (Bhuin i Roy, 2014).

Neki od Rab proteina uključeni su u stvaranje i kretanje vezikula. Zbog svoje određene lokalizacije u stanici koriste se često kao markeri za različite organele (Rodman i Wandinger-ness, 2008). Većina Rab proteina nije tkivno i stanično specifična, no ipak neki Rab proteini nalaze se samo u određenoj vrsti tkiva i stanica. Tako npr. protein Rab3A povezan je sa sinapsom vezikula neurona, Rab 17 eksprimira se samo u epitelnim stanicama, Rab13 vezan je uz Sec4 protein i nalazi se u različitim epitelnim stanicama, Rab18 koristi se kao marker praćenja dinamike lipidnih kapljica, Rab32 je u GTP stanju vezan za cijepanje mitohondrija, a Rab12 zadužen je za prijenos iz perifernih područja do perinuklearnih centrosoma (Bhuin i Roy, 2014). Unutarstanična lokalizacija Rab proteina određuje njihov put regulacije. Rab1 i Rab2 nalaze se u endoplazmatskom retikulumu, za razliku od Rab33, koji je pak lokaliziran unutar Golgijevog aparata. Rab7 koristi se kao marker za kasne endosome, jer sudjeluje u transportu od ranog do kasnog endosoma te sudjeluje u autofagiji (Brighouse i sur., 2010), dok se Rab5 koristi kao marker rane endocitoze, jer igra ključnu ulogu u ranim fazama endocitoze.

Rab4 se nalazi na sortirajućim endosomima i regulira recikliranje integrina. Rab9 i Rab24 zaduženi su za transport od kasnog endosoma do lizosoma. Rab8 i Rab10 sudjeluju u transportu od bazolateralne membrane do Golgijevog aparata, dok Rab 15 u transportu od reciklirajućeg endosoma do bazolateralne membrane. Rab3, Rab11, Rab26, Rab27, Rab37 i Rab38 prenose vezikule od trans-Golgijeve mreže do bazolateralne membrane. Rab11 nalazi se kod reciklirajućeg endosoma, Rab23 posreduje između plazmatske membrane i ranog endosoma, a Rab21 nalazi se u ranim endocitnim putevima. Rab14 uključen je u transport između ranog endosoma i Golgijevog aparata, dok Rab 34 sudjeluje u stvaranju pinosoma (Bhuin i Roy, 2014).

Zbog niza funkcija Rab proteina široko su prihvaćeni kao jedni od ključnih regulatora unutarstanične organizacije, a poremećaj u funkcionalnosti Rab proteina povezuje se s razvojem niza bolesti (Vázquez-Martínez i xMalagón, 2010).



*Slika 15.* Lokalizacija Rab obitelji proteina (preuzeto iz Bhuin i Roy, 2014)

**Tablica 3.** Obitelj Rab proteina, lokalizacija, funkcija (Bhuin i Roy, 2014).

<i>Rab</i>	<b>LOKALIZACIJA I FUNKCIJA</b>
<i>Rani endosom</i>	
<b><i>Rab5</i></b>	<b>Endocitna internalizacija (klatrinski vezikul) i rana fuzija endosoma</b>
<i>Rab21</i>	Endocitna internalizacija (rani endosom)
<i>Rab15</i>	Inhibitor endocitne internalizacije (rani i reciklirajući endosom)
<i>Rab23</i>	Transport između plazmatske membrane i ranog endosoma
<i>Rab4</i>	Transport između ranog endosoma do reciklirajućeg endosoma
<b><i>Golgijev aparat, reciklirajući endosom i sekretorni organeli</i></b>	
<i>Rab14</i>	Transport od ranog endosoma do Golgijevog aparata
<i>Rab6/Rab33</i>	Unutarnji transport (Golgijev aparat)
<i>Rab3</i>	Transport između trans-Golgijeve mreže i apikalno-lateralne membrane
<i>Rab22/Rab31</i>	Transport između trans-Golgijeve mreže i ranog endosoma
<i>Rab1/Rab2/Rab18/Rab43</i>	Transport između Endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata
<b><i>Rab11</i></b>	<b>Transport od Golgijevog aparata do reciklirajućeg endosoma</b>
<i>Rab17/Rab35</i>	Transport unutar reciklirajućeg endosoma
<i>Rab8/Rab10</i>	Transport između Golgijevog aparata i bazolateralne membrane
<i>Rab27/Rab38</i>	Transport vezikula od trans-Golgijeve mreže do bazolateralne membrane
<b><i>Kasni endosom</i></b>	
<b><i>Rab7</i></b>	<b>Kontroliranje transporta kod kasnog endosoma</b>
<b><i>Rab9</i></b>	<b>Transport između kasnog endosoma i trans-Golgijeve mreže</b>
<i>Rab12</i>	Transport od perifernih regija do perinuklearnog centrosoma
<i>Rab20/Rab25</i>	Apikalno-reciklirajući endosomi
<i>Rab24</i>	Proces autofagije
<i>Rab26/Rab37</i>	Transport sekretornih granula i vezikula od trans-Golgijeve mreže do apikalno-lateralne membrane (egzocitoza)



### **5.3. Ključni Rab proteini u endocitnom putu adenovirusa**

Ulaskom adenovirusa u stanicu putem određene vrste endocitoze (u većini slučajeva klatrin posredovane endocitoze) pokreću se različiti transportni mehanizmi. Transportnim mehanizmima unutar stanice cilj je zarobiti adenovirus unutar lizosoma i uzrokovati njegovu degradaciju, no adenovirus je razvio mehanizme uz pomoć kojih uspijeva izbjeći degradaciju u lizosomu i nastaviti unutarstanično putovanje do svog konačnog odredišta, jezgre. Transport adenovirusa do jezgre uključuje nekoliko endosomatskih odjeljaka te Rab protein, koje adenovirus koristi kako bi se ostvarila uspješna infekcija. Među glavnim pomagačima u infekciji stanice adenovirusom nalaze se Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11 proteini (**Slika 16**).

#### **5.3.1. Rab 5**

Ulaskom adenovirusa u stanicu putem klatrin posredovane endocitoze i formiranjem vezikule obložene klatrinom, dolazi do odvajanja endosomske vezikule od plazma membrane te stapanja vezikule s ranim endosomom, a upravo taj proces ovisi o ključnom Rab5 proteinu, koji se stoga smatra pogodnim markerom rane endocitoze. Nova saznanja govore da Rab5 također regulira pokretljivost endocitnih struktura ovisnih o mikrotubulama (Stenmark i Olkkonen, 2001). Interakcijom između SNARE receptora (proteini, posrednici u fuziji vezikula) i Rab5 GTPaze na površini vezikule s antigenom EEA-1 (rani endosomski antigen 1) ranog endosoma započinje proces acidifikacije (snižavanja pH). Acidifikacija endosoma uključuje aktivnost endosomskih H<sup>(+)</sup>-ATPaza, prijelaskom H<sup>+</sup> iona u endosome, čime dolazi do pada pH unutar ranog endosoma na 6-6,5 (Bhuin i Roy, 2014). Nakon navedenih događaja, izmjena Rab5 proteina s Rab7 igra ključnu ulogu u daljnjem endocitnom putu i sazrijevanju endosoma.

#### **5.3.2. Rab 7**

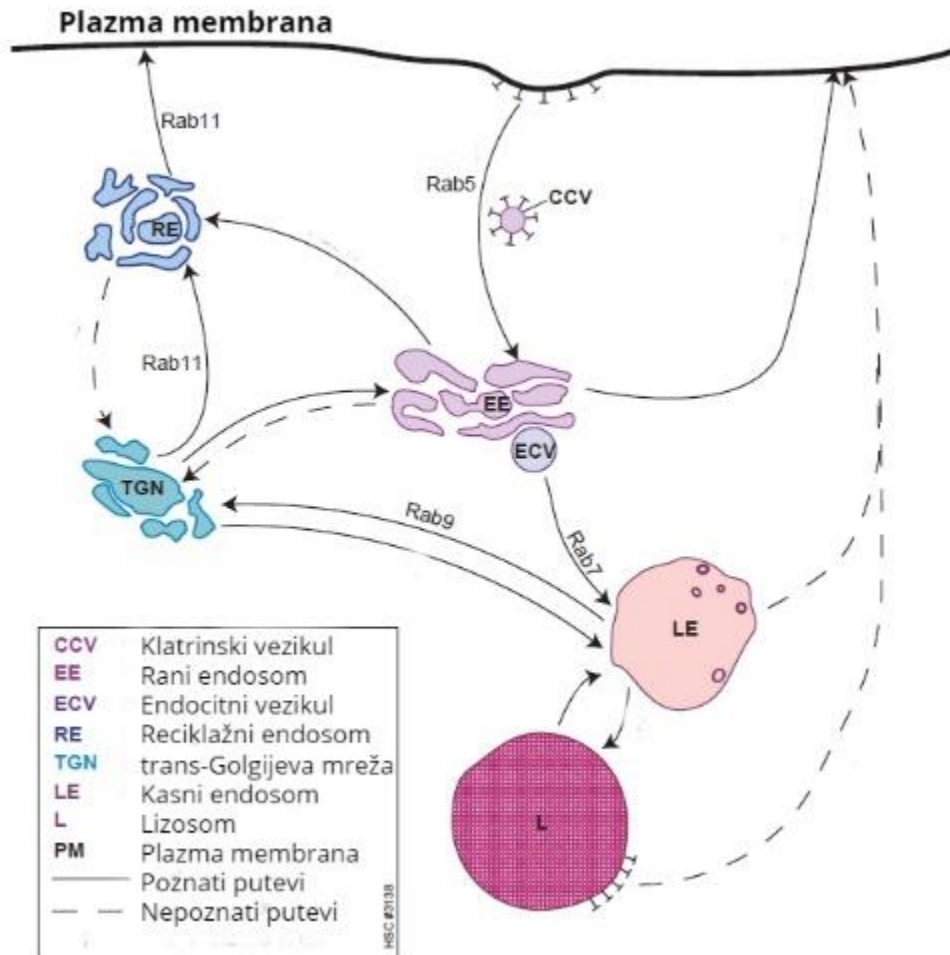
Adenovirusi se nakon ulaska u stanicu usmjeravaju prema lizosomu, no prilikom transporta pronašli su naći za “bijeg” iz endosoma te put prema jezgri. Nakon snižavanja pH u ranom endosomu te sortiranjem endosoma, adenovirusi prelaze u kasni endosom uz pomoć ključnog faktora i markera kasnog endosoma Rab7 (Elgner i sur., 2018). Promjenom pH (zakiseljavanjem) endosoma mijenja se struktura adenovirusa (oslobađa se protein VI iz kapside) što dovodi do pucanja membrane kasnog endosoma i izlaska adenovirusa u citoplazmu (Perez i Carrasco, 1994).

### **5.3.3. Rab 9**

Uloga Rab9 proteina smatra se bitnom te uključenom u endocitni put infekcije stanice adenovirusom. Rab9 nalazi se na putu od kasnog endosoma do trans-Golgijske mreže, kasnog endosoma do plazmatske membrane te se smatra uključenim u oslobađanje virusnih čestica iz endosoma (Bhuin i Roy, 2014) (Rodman i Wandinger-ness, 2008). Za otpuštanje virusa potreban je efektor formiranja vezikule TIP47 (engl. *Tail Interactin Protein 47*) te je otkriveno da interakcijom između TIP47 i Rab9 dolazi do regrutacije receptora manoze-6-fosfata u TIP47, uzrokujući stvaranje transportne vezikule. Odsutnošću interakcije između Rab9 i TIP47, dolazi do usmjeravanja čestice adenovirusa prema autofagiji (Park, 2013). Izlaskom adenovirusa iz endosoma, AdV se nalazi u citosolu, a kako bi stigao do jezgre, koristi se mrežom mikrotubula uz pomoć kojih se zatim prenosi do jezgre stanice. (Greber i sur., 1997).

### **5.3.4. Rab 11**

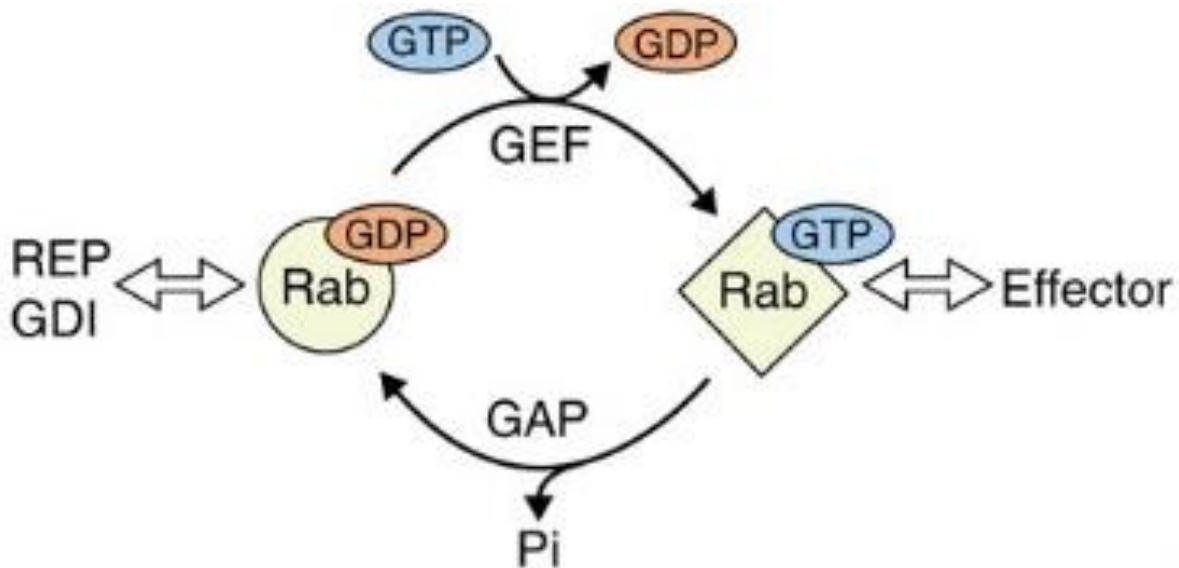
Zbog složenosti Rab11 proteina u različitim vrstama teško je procijeniti njegovu preciznu funkciju u unutarstaničnom transport, naročito kad se uzme u obzir da je Rab11 pronađen u različitim dijelovima unutarstaničnog transporta. Tako je Rab11 nađen u endocitnom putu od trans-Golgijske mreže do reciklirajućeg endosoma, od reciklirajućeg endosoma do trans-Golgijske mreže, a nalazi se i u egzocitnim putevima od reciklirajućeg endosoma do plazmatske membrane i od trans-Golgijske mreže do plazmatske membrane (Bhuin i Roy, 2014). Adenovirusi koriste Rab11 za izlazak upakiranih novonastalih virusnih čestica iz stanice. Dakle, Rab11 igra važnu ulogu u presjeku između endocitnih i egzocitnih putova unutar stanice (Rodman i Wandinger-ness, 2008).



**Slika 16.** Endocitni putevi regulirani Rab5, Rab7, Rab9 i Rab11 proteinima prilagođeno iz (Rodman i Wandinger-ness, 2008).

## 5.4. Regulatori Rab proteina

Rab proteini funkcioniraju izmjenom između aktivnog RabGTP (gvanozin-trifosfat) i neaktivnog RabGDP (gvanozin-difosfat) oblika. Kad su u neaktivnom GDP obliku, nalaze se u citosolu, a nakon aktivacije bivaju translocirani kružeći tako između membrane i citosola ovisno o aktivnosti GDI (inhibitor disocijacije GDP-a). Neaktivni Rab proteini vezani za GDP nalaze se u citosolu vezanom za GDI. Približavanjem ciljanoj membrani, GEF stupa u interakciju s Rab-om kako bi olakšao disocijaciju GDI-a i umetanje Rab-a u membranu. GEF (čimbenik izmjene nukleotida gvanina) katalizira disocijaciju GDP-a na membrani omogućujući tako vezanje GTP-a i aktivaciju. Aktivirani Rab interakcijom s različitim efektorima potiče stvaranje i kretanje vezikula. Hidroliza GTP-a na Rabu spajanjem s GAP-om (protein koji aktiviraju GTP), pretvara ga u neaktivno stanje GDP (Slika 17), koje uz pomoć GDI reciklira natrag neaktivni Rab u membranu (Rodman i Wandinger-ness, 2008)(Bhuin i Roy, 2014).



Slika 17. Ciklus Rab GTPaze (preuzeto iz Stenmark i Olkkonen, 2001).

## 5.5. Poremećaj Rab proteina

Zbog važnosti Rab proteina u svim unutarstaničnim putevima te odražavanju homeostaze stanice, poremećaj u funkciji i aktivnosti Rab proteina može uvelike utjecati na organizam. Rab proteini reguliraju unutarstanični promet u neuronima pazeći na kontinuirani protok membrane u sinapsi, gdje sinaptički mjehurići konstantno kruže u ciklusima endocitoze i egzocitoze te kontrolirajući transport duž dendrita i aksona iz stanice i do stanice zbog signalizacije (Veleri i sur., 2018). Rab proteini uključeni su u regulaciju transporta imunoloških receptora, lučenju citokina i kemokina te u procesima endocitoze i fagocitoze zbog moduliranja imunološkog odgovora. Membranski transport posredovan Rab proteinima ima važnu ulogu u karcinomu, gdje zbog promjene u prometu integrina ili MT1-MMP (membranskog tipa 1-matične metaloproteinaze) dolazi do porasta migracije i invazivnosti stanica karcinoma (Bravo-Cordero i sur., 2007). Mutacije i poremećaji regulacije Rab proteina povezani su s rakom, neurodegenerativnim bolestima, imunološkim poremećajima, itd.

Alzheimerova bolest (AD) najčešća je neurodegenerativna bolest. Većina slučajeva AD nije povezana s mutacijama i genetskim izmjenama, dok je 5-10% slučajeva povezano s mutacijom PSEN1 (Presenilina 1), PSEN2 (Presemilina 2) i APP (proteina amiloidnog prekursora). PSEN1 uključen je u regulaciju membranskog transporta i veže se na RabGDI. RabGDI se veže za Rab proteine u citosolu isporučujući ih prema staničnoj membrani. Smanjenjem količine RabGDI povezanog s membranama automatski smanjuje razinu membranski povezanih Rab GTPaza (Scheper i sur., 2000). Transportni put od Golgijevog aparata do Endoplazmatskog retikuluma (ER) regulira Rab6 pa stoga smanjeno povezivanje Rab6 s membranom rezultira neispravnim recikliranjem vezikula od Golgija do ER-a kod pacijenata s AD. Sporadični slučajevi AD povezani su s regulacijom transkripcije Rab GTPase. Ekspresije ranih endosomskih proteina poput Rab4 i Rab5, kasnih endosomalnih Rab7 i egzocitnih Rab27 pokazale su se povećane u bazalnim neuronima prednjeg mozga te su povezane s kognitivnim padom kod osoba s blagim kognitivnim oštećenjem i AD (Ginsberg i sur., 2011).

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) progresivni je neurodegenerativni poremećaj koji utječe na motorne neurone, moždano stablo i leđnu moždinu. Oko 10% slučajeva ALS-a genetski je uvjetovano i uzrokovano mutacijom specifičnih gena. Transportna membrana u motornim neuronima pokriva veliku udaljenost duž aksona zbog čega disfunkcije unutarstaničnog transporta imaju veliku ulogu u ovoj bolesti (DeJesus-Hernandez i sur., 2011). Haploinsuficijencija (promjena jednog gena dok drugog ne) C9orf72 uzrokuje degeneraciju motornih neurona te gubitak funkcije C9orf72 u patogenezi ALS-a. C9orf72 je uglavnom lokaliziran na Rab5 rane endosome te je broj lizosoma smanjen čime se ukazuje na defekte u endosomskom sazrijevanju i lizosomskoj biogenezi. Kemijski modulatori Rab5 efektor povećavaju funkciju C9orf72 što dovodi do opravka u preživljavanju neurona kod ALS-s bolesnika (Hung i sur., 2018).

Parkinsonovu bolest (PD) karakterizira nakupljanje Lewyjevih tijela (unutarstaničnih inkluzija) koje sadrže protein  $\alpha$ -syn ( $\alpha$ -sinuklein) i gubitak neurona dovodeći do nedostatka dopamina. Nekoliko mutacija gena povezuje se s PD kao što su mutacije na  $\alpha$ -syn i mutacije Rab proteina. Studije na životinjskim modelima pridonijele su razjašnjenju uloge Rab proteina u PD. U istraživanjima provedenim na modelu *Drosophila melanogaster* (vinska mušica), koja nosi mutaciju gena  $\alpha$ -syn, poticanjem prekomjerne ekspresije Rab11 smanjuje se gubitak neurona, dok se motorička oštećenja uzrokovana mutacijom  $\alpha$ -syna ublažavaju, čime se daje na važnosti u uporabi Raba11 u terapiji PD (Breda i sur., 2015).

Nadalje, Chronova bolest (CD) je upalna bolest crijeva koju karakterizira kronična upala gastrointestinalnog trakta. CD se karakterizira gubitkom integriteta sluzničke barijere i dolazi do povećane propusnosti crijeva. Pokazalo se kako disfunkcija Rab13, koji je uključen u bazolateralne transportne puteve kod bolesnika s CD-om može biti odgovorna za oštećenja nastala na sluznici (T. i sur., 2009).

Rab proteini često se povezuju s rakom, što najviše uključuje Rab proteine koji su uključeni u mehanizme endocitoze, recikliranje adhezijskih molekula i diobu stanice (**Tablica 4**). Ovisno o vrsti ili podvrsti raka, Rab proteini djeluju kao promotori tumora ili njegovi supresori. Jedan od primjera je Rab25 koji pojačava transport i invazivnost u stanicama raka dojke i jajnika kontrolirajući promet  $\alpha 5\beta 1$  integrina recikliranjem endosoma. Dok kod kolorektalnog karcinoma, karcinoma skvamoznih stanica jednjaka, trostruko negativnog karcinoma dojke, Rab25 djeluje kao supresor tumora i njegov gubitak potiče razvoj crijevne neoplazije kod miševa (Tong i sur., 2012)

**Tablica 4.** Promjene Rab proteina povezane s rakom (prilagođeno iz Guadagno i Progida, 2019)

<b>Rab5</b>	<b>Prekomjernom ekspresijom potiče signalne puteve uključene u migraciju, invaziju i metastaze tumorskih stanica</b>
<b>Rab11</b>	Pridonosi invaziji tumorskih stanica
<b>Rab1a</b>	Prekomjernom ekspresijom pospješuje onkogeni rast aktiviranjem specifičnih signalnih puteva
<b>Rab25</b>	Prekomjerna ekspresija pojačava migraciju i invazivnost stanica
<b>Rab40b</b>	Prekomjerna ekspresija potiče invaziju raka i stvaranja metastaza
<b>Rab22a</b>	Prekomjerna ekspresija uključena je u migraciju, invaziju i metastaziranje tumora uzrokovanih hipoksijom
<b>Rab23</b>	Izmijenjena ekspresije ili prekomjerna ekspresija induciraju migraciju, invaziju i proliferaciju stanica

## 6. ZAKLJUČAK

Adenovirusi (AdV) su široko rasprostranjeni virusi koji uzrokuju pretežno blage infekcije dišnog, okularnog i gastrointestinalnog sustava čovjeka, ali i ostalih kralježnjaka, kao što su ribe, ptice, sisavci. Nemaju onkogeni potencijal u čovjeku, a zbog lake manipulacije genoma, odsutnosti štetnih posljedica na čovjeka, mogućnosti ubacivanja strane DNA u stanicu, istražuju se u brojnim kliničkim ispitivanjima, primjerice genskoj terapiji, liječenju tumora i vakcinaciji. Postoji 67 tipova adenovirusa koji su podijeljeni u skupine od A-G. Adenovirusi su dobro istraženi, a najviše istražen tip je Ad5, koji je ujedno i najprevalentniji u populaciji.

Kako bi uspješno inficirao stanicu i proveo ciklus umnažanja, AdV koriste brojne stanične mehanizme i proteine, kako one za dostavu virusne DNA u jezgru stanice domaćina tako i stanične mehanizme za ekspresiju gena virusa odnosno proizvodnju virusnih proteina. Životni ciklus adenovirusa započinje vezanjem za receptor na staničnoj membrani, a u stanicu ulazi određenim tipom endocitoze, koja je uvjetovana tipom receptora za koji se AdV vezao. Najčešće se radi o klatrin-posredovanoj endocitozi, pri kojoj virus ulazi unutar klatrinskog mjehurića i stapa se s ranim endosomom, što je ovisno o proteinu Rab5. Kako bi izbjegao degradaciju u lizosomu, adenovirus uz pomoć različitih mehanizama uspijeva pobjeći iz endosoma, pri čemu su mu potrebni neki od ključnih događaja (zakiseljavanje unutar endosoma, aktivacija integrina, izloženost strukturnog proteina VI s viralne kapside, permeabilizacija i pucanje endosomalne membrane, izmjena Rab5/7 proteina), a za samo oslobađanje adenovirusa iz endosoma, važnim se smatra protein Rab9.

Nakon što virus izađe iz endosoma, nalazi se u viskoznom citosolu i nastavlja svoje unutarstanično putovanje po mikrotubulima te uz pomoć motornog proteina dineina (ili kinezina) kreće sve do finalnog odredišta – jezgre. Nakon što AdV doputuje do kompleksa jezgrinih pora, predaje svoju DNA unutar jezgre, a razmotana viralna kapsida ostaje u citosolu. U jezgri započinje replikacija viralne DNA, dok se replikacija stanične DNA inhibira. Novopakirane virusne čestice zatim uz pomoć transportnog Rab11 proteina odlaze prema staničnoj membrani i izlaze iz stanice, čime je završen životni ciklus umnažanja adenovirusa.



Stoga, kako bi si osigurao uspješnu infekciju i preživljenje, AdV komunicira sa stanicom i koristi stanične mehanizme i proteine, a pritom izbjegava unutarstanični endocitni put kojim stanica uništava sve što joj potencijalno može naškoditi.

U samom unutarstaničnom putovanju, Rab proteini pokazali su se ključnima i to specifično proteini Rab 5, 7, 9 i 11. Postoje brojne studije u kojima se proučavaju različite faze unutarstaničnog putovanja adenovirusa pomoću mutiranih oblika navedenih proteina, kako bi se proučili mehanizmi kojima adenovirus osigurava uspješnu infekciju u stanicama čovjeka. Rab proteini su od iznimne važnosti za stanicu, što govori u prilog činjenica da je genomska regija, koja kodira za te proteine iznimno konzervirana među vrstama. Shodno tome, prepoznate su brojne bolesti u kojima je došlo do poremećaja u funkciji Rab proteina te se radi o potencijalno zanimljivim molekulama – metama u razvoju novih pristupa terapije usmjerene na adenovirusom uzorkovana oboljenja.

## 7. LITERATURA

1. Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: Implications for targeting of viral vectors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(8), 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.005>
2. Bauer, M., Flatt, J. W., Seiler, D., Cardel, B., Emmenlauer, M., Boucke, K., Suomalainen, M., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2019). The E3 Ubiquitin Ligase Mind Bomb 1 Controls Adenovirus Genome Release at the Nuclear Pore Complex. *Cell Reports*, 29(12), 3785–3795.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.064>
3. Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>
4. Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y. B., Freimuth, P., & Flanagan, J. M. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science*, 286(5444), 1579–1583. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1579>
5. Bhui, T., & Roy, J. K. (2014). Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research*, 328(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.027>
6. Bidgood, S. R., Tam, J. C. H., McEwan, W. A., Mallery, D. L., & James, L. C. (2014). Translocalized IgA mediates neutralization and stimulates innate immunity inside infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(37), 13463–13468. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410980111>
7. Boisvert, M., & Tjisse, P. (2012). Endocytosis of Non-Enveloped DNA Viruses. *Molecular Regulation of Endocytosis*. <https://doi.org/10.5772/45821>
8. Bravo-Cordero, J. J., Marrero-Díaz, R., Megías, D., Genís, L., García-Grande, A., García, M. A., Arroyo, A. G., & Montoya, M. C. (2007). MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *EMBO Journal*, 26(6), 1499–1510. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601606>
9. Breda, C., Nugent, M. L., Estranero, J. G., Kyriacou, C. P., Outeiro, T. F., Steinert, J. R.,

- & Giorgini, F. (2015). Rab11 modulates  $\alpha$ -synuclein-mediated defects in synaptic transmission and behaviour. *Human Molecular Genetics*, *24*(4), 1077–1091.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu521>
10. Brighthouse, A., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2010). Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(20), 3449–3465. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0436-1>
  11. Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., & Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, *62*(2), 317–329. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90369-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90369-P)
  12. Cox, F., Van Der Fits, L., Abbink, P., Larocca, R. A., Van Huizen, E., Saeland, E., Verhagen, J., Peterson, R., Tolboom, J., Kaufmann, B., Schuitemaker, H., Barouch, D. H., & Zahn, R. (2018). Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge. *PLoS ONE*, *13*(8), 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202820>
  13. Daniel, J. A., Chau, N., Abdel-Hamid, M. K., Hu, L., von Kleist, L., Whiting, A., Krishnan, S., Maamary, P., Joseph, S. R., Simpson, F., Haucke, V., McCluskey, A., & Robinson, P. J. (2015). Phenothiazine-Derived Antipsychotic Drugs Inhibit Dynamin and Clathrin-Mediated Endocytosis. *Traffic*, *16*(6), 635–654.  
<https://doi.org/10.1111/tra.12272>
  14. Deal, C., Pekosz, A., & Ketner, G. (2013). Prospects for oral replicating adenovirus-vectored vaccines. *Vaccine*, *31*(32), 3236–3243.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.016>
  15. DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Gilmer, F., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., ... Boylan, K. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, *72*(2), 245–256.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011.Expanded>
  16. Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., & Lambright, D. G. (2005). Structural basis of family-

- wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature*, 436(7049), 415–419.  
<https://doi.org/10.1038/nature03798>
17. Elgner, F., Hildt, E., & Bender, D. (2018). Relevance of rab proteins for the life cycle of hepatitis C virus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(DEC), 1–15.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00166>
18. Emdad, L., Das, S. K., Wang, X. Y., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2018). Cancer terminator viruses (CTV): A better solution for viral-based therapy of cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 5684–5695. <https://doi.org/10.1002/jcp.26421>
19. Ewer, K., Rampling, T., Venkatraman, N., Bowyer, G., Wright, D., Lambe, T., Imoukhuede, E. B., Payne, R., Fehling, S. K., Strecker, T., Biedenkopf, N., Krähling, V., Tully, C. M., Edwards, N. J., Bentley, E. M., Samuel, D., Labbé, G., Jin, J., Gibani, M., ... Hill, A. V. S. (2016). A monovalent chimpanzee adenovirus ebola vaccine boosted with MVA. *New England Journal of Medicine*, 374(17), 1635–1646.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411627>
20. Gabe Lee, M. T., Mishra, A., & Lambright, D. G. (2009). Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by Rab GTPases. *Traffic*, 10(10), 1377–1389.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00942.x>
21. Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., & Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature Medicine*, 9(11), 1408–1412.  
<https://doi.org/10.1038/nm952>
22. Gallaher, S. D., & Berk, A. J. (2013). A rapid Q-PCR titration protocol for adenovirus and helper-dependent adenovirus vectors that produces biologically relevant results. *Journal of Virological Methods*, 192(1–2), 28–38.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.013>
23. Ginsberg, S. D., Mufson, E. J., Alldred, M. J., Counts, S. E., Wu, J., Nixon, R. A., & Che, S. (2011). Upregulation of select rab GTPases in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42(2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.012>
24. 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(1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>

25. Greber, U. F. (2020). Adenoviruses – Infection, pathogenesis and therapy. *FEBS Letters*, 594(12), 1818–1827. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13849>
26. Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W., & Helenius, A. (1997). The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO Journal*, 16(19), 5998–6007. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5998>
27. Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., & Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75(3), 477–486. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90382-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90382-Z)
28. Guadagno, N. A., & Progida, C. (2019). Rab GTPases: Switching to Human Diseases. *Cells*, 8(8), 909. <https://doi.org/10.3390/cells8080909>
29. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., & Phipps, M. L. (1997). Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *Journal of Virology*, 71(3), 1842–1849. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.1842-1849.1997>
30. HE, T., LF, L., GJ, D., WT, W., SC, C., ML, K., R, T., GS, L., & MH, T. (2012). Pro-opiomelanocortin gene delivery suppresses the growth of established Lewis lung carcinoma through a melanocortin-1 receptor-independent pathway. *Journal of Gene Medicine*, 14(1), 44–53. <https://doi.org/10.1002/jgm>
31. Hendrix, R. W. (1999). Evolution: The long evolutionary reach of viruses. *Current Biology*, 9(24), 914–917. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80103-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80103-7)
32. Hung, S., Hendricks, E., Linares, G. R., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Michael, J., Vangoor, V. R., Senthilkumar, K., Hennes, V., Chen, J. A., Wisniewski, N., Victor, H., & Belgard, T. G. (2018). *HHS Public Access*. 24(3), 313–325. <https://doi.org/10.1038/nm.4490.Haploinsufficiency>
33. Kälin, S., Amstutz, B., Gastaldelli, M., Wolfrum, N., Boucke, K., Havenga, M., DiGennaro, F., Liska, N., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2010). Macropinocytotic Uptake and Infection of Human Epithelial Cells with Species B2 Adenovirus Type 35. *Journal of Virology*, 84(10), 5336–5350. <https://doi.org/10.1128/jvi.02494-09>
34. Kanerva, A., & Hemminki, A. (2005). Adenoviruses for treatment of cancer. *Annals of Medicine*, 37(1), 33–43. <https://doi.org/10.1080/07853890410018934>
35. Kelkar, S. A., Pfister, K. K., Crystal, R. G., & Leopold, P. L. (2004). Cytoplasmic Dynein Mediates Adenovirus Binding to Microtubules. *Journal of Virology*, 78(18),

- 10122–10132. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.18.10122-10132.2004>
36. Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P., & Horwitz, M. S. (2003). The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Reviews in Medical Virology*, *13*(3), 155–171. <https://doi.org/10.1002/rmv.386>
37. Kozarsky, K. F., & Wilson, J. M. (1993). Gene therapy: adenovirus vectors. *Current Opinion in Genetics and Development*, *3*(3), 499–503. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(93\)90126-A](https://doi.org/10.1016/0959-437X(93)90126-A)
38. Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T. C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes and Diseases*, *4*(2), 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
39. Li, H., Rhee, E. G., Masek-Hammerman, K., Teigler, J. E., Abbink, P., & Barouch, D. H. (2012). Adenovirus Serotype 26 Utilizes CD46 as a Primary Cellular Receptor and Only Transiently Activates T Lymphocytes following Vaccination of Rhesus Monkeys. *Journal of Virology*, *86*(19), 10862–10865. <https://doi.org/10.1128/jvi.00928-12>
40. Lion, T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(3), 441–462. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>
41. Liu, H., Jin, L., Koh, S. B. S., Atanasov, I., Schein, S., Wu, L., & Zhou, Z. H. (2010). Atomic structure of human adenovirus by Cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science*, *329*(5995), 1038–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1187433>
42. Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Zubkova, O. V, Tikhvatullin, A. I., Shcheblyakov, D. V, Dzharullaeva, A. S., Grousova, D. M., Erokhova, A. S., Kovyrshina, A. V, Botikov, A. G., Izhaeva, F. M., Popova, O., Ozharovskaya, T. A., Esmagambetov, I. B., Favorskaya, I. A., Zrelkin, D. I., Voronina, D. V, Shcherbinin, D. N., Semikhin, A. S., ... Gintsburg, A. L. (2020). Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet (London, England)*, *6736*(20), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
43. Lyle, C., & McCormick, F. (2010). Integrin  $\alpha\beta 5$  is a primary receptor for adenovirus in

- CAR-negative cells. *Virology Journal*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-148>
44. Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., & Heim, A. (2005). Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants of All Human Adenovirus Prototypes as a Basis for Molecular Classification and Taxonomy. *Journal of Virology*, 79(24), 15265–15276. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.24.15265-15276.2005>
45. Majhen, D., Calderon, H., Chandra, N., Fajardo, C. A., Rajan, A., Alemany, R., & Custers, J. (2014). Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: Progress in the field. *Human Gene Therapy*, 25(4), 301–317. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.235>
46. Manzanares, D., & Ceña, V. (2020). Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics*, 12(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371>
47. Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrm1315>
48. May, R. C., & Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 114(6), 1061–1077.
49. McConnell, M. J., & Imperiale, M. J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 15(11), 1022–1033. <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.1022>
50. Meier, O., Boucke, K., Hammer, S. V., Keller, S., Stidwill, R. P., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *Journal of Cell Biology*, 158(6), 1119–1131. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112067>
51. Meier, O., & Greber, U. F. (2003). Adenovirus endocytosis. *Journal of Gene Medicine*, 5(6), 451–462. <https://doi.org/10.1002/jgm.409>
52. Mercier, S., Rouard, H., Delfau-Larue, M. H., & Eloit, M. (2004). Specific antibodies modulate the interactions of adenovirus type 5 with dendritic cells. *Virology*, 322(2), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.01.031>
53. Morris, S. J., Scott, G. E., & Leppard, K. N. (2010). Adenovirus Late-Phase Infection Is Controlled by a Novel L4 Promoter. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00107-10>

54. Nestić, D., Uil, T. G., Ma, J., Roy, S., Vellinga, J., Baker, A. H., Custers, J., & Majhen, D. (2018).  $\alpha\beta 3$  Integrin Is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26. *Journal of Virology*, *93*(1).  
<https://doi.org/10.1128/jvi.01474-18>
55. Park, H. H. (2013). Structural basis of membrane trafficking by rab family small G protein. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 8912–8923.  
<https://doi.org/10.3390/ijms14058912>
56. Parks, R. J. (2005). Adenovirus protein IX: A new look at an old protein. *Molecular Therapy*, *11*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.09.018>
57. Parton, R. G. (2016). Clathrin Independent Endocytosis. *Encyclopedia of Cell Biology*, *2*, 394–400. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20039-4>
58. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., & Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, *3*(5), 473–483. <https://doi.org/10.1038/35074539>
59. Pelkmans, L., Püntener, D., & Helenius, A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, *296*(5567), 535–539. <https://doi.org/10.1126/science.1069784>
60. Perez, L., & Carrasco, L. (1994). Involvement of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in animal virus entry. *Journal of General Virology*, *75*(10), 2595–2606.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2595>
61. Rodman, J. S., & Wandinger-ness, A. (2008). Rab-GTPases. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, *192*, 1059–1059. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7\\_6574](https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7_6574)
62. Rodríguez, E., & Everitt, E. (1996). Adenovirus uncoating and nuclear establishment are not affected by weak base amines. *Journal of Virology*, *70*(6), 3470–3477.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.70.6.3470-3477.1996>
63. Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G. M., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I., & Wickham, T. J. (1998). The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as a Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E, and F. *Journal of Virology*, *72*(10), 7909–7915.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.72.10.7909-7915.1998>
64. Rosenfeld, M. A., Siegfried, W., Yoshimura, K., Yoneyama, K., Fukayama, M., Stier, L.



- E., Pääkkö, P. K., Gilardi, P., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., Jallat, S., Pavirani, A., Lecocq, J. P., & Crystal, R. G. (1991). Adenovirus-mediated transfer of a recombinant  $\alpha 1$ -antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science*, 252(5004), 431–434. <https://doi.org/10.1126/science.2017680>
65. Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*, 81(11), 2573–2604. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2573>
66. Safronetz, D., Hegde, N. R., Ebihara, H., Denton, M., Kobinger, G. P., St. Jeor, S., Feldmann, H., & Johnson, D. C. (2009). Adenovirus Vectors Expressing Hantavirus Proteins Protect Hamsters against Lethal Challenge with Andes Virus. *Journal of Virology*, 83(14), 7285–7295. <https://doi.org/10.1128/jvi.00373-09>
67. Samaj, J., Baluška, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D., Menzel, D., & Cytoskeleton, A. (2005). Schedules and Dictionary Sydney Local Environmental Plan. *Plant Physiol*, 135(December), 1150–1161. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040683.1150>
68. San Martín, C., & Burnett, R. M. (2003). Structural studies on adenoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 272, 57–94. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7_3)
69. Scheper, W., Zwart, R., Van Der Sluijs, P., Annaert, W., Van Gool, W. A., & Baas, F. (2000). Alzheimer's presenilin 1 is a putative membrane receptor for rab GDP dissociation inhibitor. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 303–310. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.303>
70. Scherer, J., & Vallee, R. B. (2011). Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon. *Viruses*, 3(8), 1417–1431. <https://doi.org/10.3390/v3081417>
71. Stasiak, A. C., & Stehle, T. (2020). Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view. In *Medical Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00645-2>
72. Stenmark, H., & Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biology*, 2(5), 1–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-reviews3007>
73. T., T., T., S., M., N. N., H., Y., D., Y., M., O., N., M., T., K., Y., K., Y., N., H., F., M., N., N., M., I., K., T., M., W., I., H., Tahara, T., Shibata, T., Nakamura, M., ... Arisawa, T. (2009). Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis.

*International Journal of Molecular Medicine*, 23(4), 521–527.

<https://doi.org/10.3892/ijmm>

74. Tamura, R. E., de Luna, I. V., Lana, M. G., & Strauss, B. E. (2018). Improving adenoviral vectors and strategies for prostate cancer gene therapy. *Clinics*, 73, 1–7. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e476s>
75. Tong, M., Chan, K. W., Bao, J. Y. J., Wong, K. Y., Chen, J. N., Kwan, P. S., Tang, K. H., Fu, L., Qin, Y. R., Lok, S., Guan, X. Y., & Ma, S. (2012). Rab25 is a tumor suppressor gene with antiangiogenic and anti-invasive activities in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 72(22), 6024–6035. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1269>
76. van Oostrum, J., & Burnett, R. M. (1985). Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *Journal of Virology*, 56(2), 439–448. <https://doi.org/10.1128/jvi.56.2.439-448.1985>
77. Vázquez-Martínez, R., & Malagón, R. (2010). Rab proteins and the secretory pathway: The case of Rab18 in neuroendocrine cells. *Frontiers in Endocrinology*, 2(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00001>
78. Veleri, S., Punnakkal, P., Dunbar, G. L., & Maiti, P. (2018). Molecular Insights into the Roles of Rab Proteins in Intracellular Dynamics and Neurodegenerative Diseases. *NeuroMolecular Medicine*, 20(1), 18–36. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8479-9>
79. Vetrini, F., & Ng, P. (2010). Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: Current advances and future perspectives. *Viruses*, 2(9), 1886–1917. <https://doi.org/10.3390/v2091886>
80. Waehler, R., Russell, S. J., & Curiel, D. T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 8(8), 573–587. <https://doi.org/10.1038/nrg2141>
81. Wang, H., Liu, Y., Li, Z., Tuve, S., Stone, D., Kalyushniy, O., Shayakhmetov, D., Verlinde, C. L. M., Stehle, T., McVey, J., Baker, A., Peng, K.-W., Roffler, S., & Lieber, A. (2008). In Vitro and In Vivo Properties of Adenovirus Vectors with Increased Affinity to CD46. *Journal of Virology*, 82(21), 10567–10579. <https://doi.org/10.1128/jvi.01308-08>
82. Wang, K., Guan, T., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (2000). Regulation of Adenovirus Membrane Penetration by the Cytoplasmic Tail of Integrin  $\beta 5$ . *Journal of*

- Virology*, 74(6), 2731–2739. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2731-2739.2000>
83. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73(2), 309–319. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90231-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90231-E)
84. Yamamoto, Y., Nagasato, M., Rin, Y., Henmi, M., Ino, Y., Yachida, S., Ohki, R., Hiraoka, N., Tagawa, M., & Aoki, K. (2017). Strong antitumor efficacy of a pancreatic tumor-targeting oncolytic adenovirus for neuroendocrine tumors. *Cancer Medicine*, 6(10), 2385–2397. <https://doi.org/10.1002/cam4.1185>
85. Yamauchi, Y., & Helenius, A. (2013). Virus entry at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(6), 1289–1295. <https://doi.org/10.1242/jcs.119685>
86. Zhang, W., Low, J. A., Christensen, J. B., & Imperiale, M. J. (2001). Role for the Adenovirus IVa2 Protein in Packaging of Viral DNA. *Journal of Virology*, 75(21), 10446–10454. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.21.10446-10454.2001>
87. Zhang, W. W., Li, L., Li, D., Liu, J., Li, X., Li, W., Xu, X., Zhang, M. J., Chandler, L. A., Lin, H., Hu, A., Xu, W., & Lam, D. M. K. (2018). The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Human Gene Therapy*, 29(2), 160–179. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>
88. Zhang, Y.-N., Liu, Y.-Y., Xiao, F.-C., Liu, C.-C., Liang, X.-D., Chen, J., Zhou, J., Baloch, A. S., Kan, L., Zhou, B., & Qiu, H.-J. (2018). Rab5, Rab7, and Rab11 Are Required for Caveola-Dependent Endocytosis of Classical Swine Fever Virus in Porcine Alveolar Macrophages. *Journal of Virology*, 92(15), 1–16. <https://doi.org/10.1128/jvi.00797-18>
89. Zhao, T., Cui, L., Yu, X., Zhang, Z., Shen, X., & Hua, X. (2019). Porcine sapelovirus enters PK-15 cells via caveolae-dependent endocytosis and requires Rab7 and Rab11. *Virology*, 529(January), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.01.009>
90. Zhu, F. C., Guan, X. H., Li, Y. H., Huang, J. Y., Jiang, T., Hou, L. H., Li, J. X., Yang, B. F., Wang, L., Wang, W. J., Wu, S. P., Wang, Z., Wu, X. H., Xu, J. J., Zhang, Z., Jia, S. Y., Wang, B. Sen, Hu, Y., Liu, J. J., ... Chen, W. (2020). Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, 396(10249), 479–488. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 06.04.1995. godine u Zagrebu, gdje sam i započela svoje školovanje. 2015. godine upisala sam preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstveno Veleučilište u Zagrebu gdje u rujnu 2018. godine stječem akademsku titulu stručne prvostupnice (bacc. med. lab. diagn.). Iste godine na Fakultetu zdravstvenih studija u Rijeci upisujem diplomski sveučilišni studij Klinički nutricionizam koji završavam 2020. godine ovim diplomskim radom pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Kraljević Pavelić i u suradnji s Laboratorijem za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod neposrednim vodstvom dr. sc. Ksenije Božinović.

Uz studij radila sam različite studentske poslove uz pomoć kojih sam stekla dobre komunikacijske vještine, timski duh i sposobnost prilagođavanja promjenama.

Posjedujem aktivno znanje engleskog jezika te znanje o radu na računalu (MS Office).