

ISRIB, inhibitor PKR posredovane blokade translacije, omogućuje efikasnu replikaciju HSV-1 u stanicama s nedostatkom ADAR1

Žilić, Lidia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:834934>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Lidia Žilić

ISRIB, inhibitor PKR posredovane blokade translacije, omogućuje efikasnu replikaciju HSV-1 u stanicama s nedostatkom ADAR1

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Lidia Žilić

ISRIB, inhibitor PKR posredovane blokade translacije, omogućuje efikasnu replikaciju HSV-1 u stanicama s nedostatkom ADAR1

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor: izv.prof.dr.sc. Igor Jurak

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
University Graduate Program
Biotechnology in medicine

Lidia Žilić

ISRIB, PKR-mediated translational arrest inhibitor, enables efficient HSV-1
replication in ADAR1 deficient cells

Master's thesis

Rijeka, 2023.

Diplomski rad obranjen je dana 26.9.2023.

pred povjerenstvom:

1. izv.prof.dr.sc. Jelena Ban
2. doc.dr.sc. Katarina Kapuralin
3. izv.prof.dr.sc. Igor Jurak

Rad ima 49 stranica, 13 slika, 4 tablice i 44 literaturna navoda.

Sažetak:

Herpes simpleks virus (HSV) je dvolančani DNA virus koji sudjeluje u razvoju različitih bolesti. Na razvoj HSV-1 infekcije utječu brojni faktori domaćina odnosno stanice (tzv. faktori virulencije) među kojima je ADAR1 protein. ADAR1 je jedan od glavnih enzima koji editira RNA te regulira brojne obrambene mehanizme stanice, uključujući modulaciju aktivacije protein kinaze R (PKR). Aktivacija PKR može dovesti do prekida sinteze proteina te time onemogućiti efikasnu replikaciju virusa. Osim proteina domaćina, brojni nestrukturani proteini virusa, poput ICP34.5, glavnog faktora neurovirulencije, inhibiraju signalne putove koji se preklapaju s ADAR1 regulacijom, uključujući PKR obranu domaćina. Koristeći se metodama transfekcije, Western Blot analize i titracije, naša istraživanja su pokazala da u stanicama s smanjenom ili dokinutom ekspresijom ADAR1 dolazi do aktivacije PKR nakon infekcije s HSV-1, neovisno o prisutnosti ICP34.5, virusnog inhibitora istih signalnih puteva. Ovi rezultati sugeriraju da je u nedostatku ADAR1 PKR aktivacijski signal presnažan i da ICP34.5 nema sposobnost inhibicije ili do aktivacije dolazi prije značajne ekspresije ICP34.5. Naša hipoteza je da će se inhibicijom aktiviranog PKR-posredovanog prekida sinteze proteina dovesti do poboljšane replikacije virusa u stanicama s nedostatkom ADAR1.

U idućem dijelu eksperimenta, uspješno smo potvrdili provirusnu ulogu ADAR1 enzima i naknadno dodane molekule ISRIB. ISRIB je farmakološki inhibitor koji se veže na eIF2 β i time premošćuje aktivaciju eIF2 α te omogućuje daljnju sintezu proteina. Naše istraživanje je potvrdilo našu hipotezu, odnosno tretiranje stanica s ISRIB dovelo je do pojačane replikacije virusa u ADAR1 KO stanicama. Međutim, na naše iznenađenje, otkrili smo da dodatak ISRIB-a kod HSV-1 infekcije rezultira i smanjenom aktivacijom kinaze PKR. Ovi rezultati ukazuju na potencijalni mehanizam regulatorne povratne sprege, međutim točan mehanizam tek treba biti potvrđen.

Ključne riječi:

HSV-1, ADAR1, faktor neurovirulencije ICP34.5, ISRIB, PKR, eIF2 α

Abstract

Herpes simplex virus (HSV) is a double-stranded DNA virus that participates in the development of various diseases. The development of HSV-1 infection is influenced by numerous host or cell factors (so-called virulence factors), among which is the ADAR1 protein. ADAR1 is one of the main enzymes that edit RNA and regulate numerous defense mechanisms of the cell, including the modulation of protein kinase R (PKR) activation. Activation of PKR can lead to block of protein synthesis and thereby prevent efficient viral replication. In addition to host proteins, a number of viral nonstructural proteins, such as ICP34.5, a major neurovirulence factor, inhibit signaling pathways that overlap with ADAR1 regulation, including host defense PKR. Using the methods of transfection, Western Blot analysis and titration, our research showed that in cells with reduced or terminated expression of ADAR1, activation of PKR occurs after HSV-1 infection, regardless of the presence of ICP34.5, a viral inhibitor of the same signaling pathways. These results suggest that in the absence of ADAR1, the PKR activation signal is too strong and that ICP34.5 has no inhibitory capacity or activation occurs before significant ICP34.5 expression. Our hypothesis is that inhibition of activated PKR-mediated shutoff of protein synthesis will lead to enhanced viral replication in ADAR1-deficient cells.

In the next part of the experiment, we successfully confirmed the proviral role of the enzyme ADAR1 and the subsequently added molecule ISRIB. ISRIB is a pharmacological inhibitor that binds to eIF2 β and thereby suppresses the activation of eIF2 α and enables further protein synthesis. Our research confirmed our hypothesis, i.e. treatment of cells with ISRIB led to enhanced virus replication in ADAR1 KO cells. However, to our surprise, we discovered that the addition of ISRIB in HSV-1 infection also results in reduced activation of the PKR kinase. These results suggest a potential

regulatory feedback mechanism, however the exact mechanism remains to be confirmed.

Key words:

HSV-1, ADAR1, neurovirulence factor ICP34.5, ISRIB, PKR kinase, eIF2 α

Zahvala

Posebnu zahvalu želim iskazati mentoru izv.prof.dr.sc. Igoru Juraku što mi je pružio priliku za rad u Laboratoriju za molekularnu virologiju. Hvala Vam na svakoj pomoći i danom savjetu tijekom izrade ovog diplomskog rada te na ukazanom strpljenju.

Isto tako, željela bih se zahvaliti svim članovima laboratorija: postdoktorandici Miji Cesarec, doktorandima Andreji Zubković i Adwaitu Parchure te ostalim članovima koji su uvelike doprinijeli ovom radu. Hvala Vam što ste uljepšali i učinili rad u laboratoriju zabavnim. Bila mi je iznimna čast i zadovoljstvo raditi uz Vas.

U konačnici, najviše bih se željela zahvaliti svojoj obitelji koji su kroz cijelo moje školovanje bili velika podrška te ključ u ostvarivanju mojih uspjeha, a samim time i njihovih. Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima koji su bili uz mene kada je bilo najteže i koji su uljepšali svaki trenutak studentskog života.

Sadržaj

1.Uvod.....	1
1.1.Herpesvirus 1	1
1.1.1.Građa i genom HSV-1	2
1.1.2.HSV-1 proteini rane i kasne infekcije	4
1.2.ICP34.5	4
1.2.1.Funkcija ICP34.5	6
1.2.1.1.Inhibicija IRF3 i PKR signalnog puta	6
1.2.1.2.Inhibicija autofagije	8
1.2.1.3.Utjecaj na sazrijevanje dendritičkih stanica	8
1.3.ADAR proteini	9
1.3.1.ADAR1 protein	11
1.3.1.1.Funkcija ADAR1 proteina.....	11
1.3.2.ADAR2 i ADAR3 protein	13
1.4.Integrirani odgovor na stres.....	15
1.4.1.ISRIB-inhibitorna molekula	17
2.Cilj rada	19
3.Materijali i metode	20
3.1.Stanične linije, bakterije i virusi.....	20
3.2.Plazmidi.....	20
3.3.Izolacija plazmidne DNA.....	20
3.3.Određivanje koncentracije izolirane DNA	22
3.4.Transfekcija HEK293A stanica s ICP34.5, pC-DNA3 i GFP plazmidima.....	22
3.5.Infekcija stanica s HSV-1.....	23
3.6.Izolacija proteina za Western Blot analizu.....	23
3.7.SDS gel elektroforeza i Western blot analiza	24
3.8.Detekcija proteina na nitroceluloznoj membrani	28
3.9.Plak esej.....	28
4.Rezultati.....	29
4.1.Replikacija HSV-1 u KO ADAR1 HEK293T stanicama.....	29
4.2.Utjecaj ISRIB molekule na virusnu replikaciju u odsustvu ADAR1 proteina .	31
4.3.Detekcija proteina ICP34.5.u HEK293T stanicama	35

5.Rasprava	38
6.Zaključak	41
7.Literatura	42
8.Životopis	47

1.Uvod

1.1. Herpesvirus 1

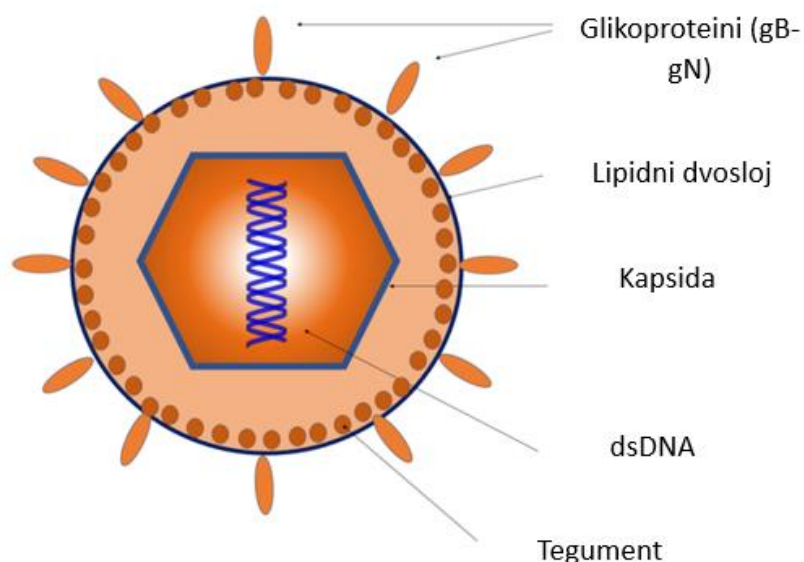
Herpes virusi pripadaju obitelji virusa *Herpesviridae*. Do sada je identificirano ukupno 9 humanih herpes virusa koji se dijele u 3 glavne skupine: *Alphaherpesviridae* ; *Betaherpesviridae*; i *Gammaherpesviridae*. U alfa-herpes viruse ubrajaju se simpleks virusi (Herpes Simplex tip 1 (HSV-1) i Herpes Simplex tip 2 (HSV-2)) te Varicella-Zoster virus (VZV)). S druge strane, beta-herpes virusima pripadaju Humani Citomegalovirus (HCMV), Humani herpes virusi 6 i 7 (HHV6;HHV7), dok gama-herpes virusi obuhvaćaju Epstein-Barr virus (EBV) i Herpes virus povezan s Kaposijevim Sarkomom (KSHV) (1). U odnosu na ostale skupine, za alfa-herpes viruse karakteristično je da imaju općenito kratak replikacijski ciklus i sposobnost da inficiraju visoki raspon domaćina (2). Alfa-herpes virusi su pantropski i imaju sposobnost uspostavljanja trajne ili latentne infekcije u živčanom sustavu domaćina (3).

HSV-1 primarno inficira stanice epitela dok se latencija i reaktivacija odvija primarno u neuronima (1). Virus je odgovoran za nastanak primarnih i rekurentnih vezikularnih erupcija, posebno u orolabijalnoj i genitalnoj sluznici. Infekcija HSV-1 može imati razne posljedice poput orolabijalnog herpesa, herpetičke sikoze (HSV folikulitis), očne HSV infekcije, herpes encefalitisa i teške ili kronične HSV infekcije. Složena i dinamična interakcija između virusno-virusnih i virusno-staničnih proteina konstantno se modificira tijekom produktivne i latentne infekcije, te predstavlja aktivno područje istraživanja (4). Na HSV infekciju može se djelovati antivirusnom terapijom (5).

1.1.1. Građa i genom HSV-1

Herpes simpleks virusi sadrže dvolančanu DNA koja se nalazi u središnjoj jezgri te se razlikuje u molekularnoj veličini, ovisno o HSV-1 i HSV-2 (1). HSV-1 sadrži dvolančanu DNA koja iznosi 152 kbp čija je jezgra okružena kapsidom veličine 100 do 110 nanometara (nm) u promjeru, koju okružuje tegument koji posjeduje strukturnu i regulatornu ulogu (6,7). Kapsidu i tegument okružuje dvoslojna lipidna ovojnica nastala od membrana stanice domaćina (7). Lipidna ovojnica se sastoji od poliamina, lipida i glikoproteina koji daju različita svojstva virusu (Slika 1) (7,8).

HSV-1 kodira za najmanje 11 glikoproteina. Glikoproteini dijele se na virusne proteine, koji služe za vezanje na stanične receptore domaćina (gB, gC, gD, gH), fuzijske proteine (gB), strukturne proteine, imunološke proteine (gE i gI) i druge frakcije (9). Osim što se razlikuju u funkciji, glikoproteini se razlikuju i u veličini i obliku. Prisutnost navedenih glikoproteina i njihovih staničnih receptora smatra se ključnim u prijenosu virusnog sadržaja u stanicu domaćina (2).



Slika 1. Schematski prikaz građe HSV-1. Ikozaedralna proteinska kapsida sadrži dvolančanu DNA. Kapsidu okružuje lipidni dvosloj, tegument i glikoproteini (gB-gN) koji imaju različite regulatorne uloge. Slika preuzeta iz Koujah L. *et al*, 2019 i prilagođena na hrvatski jezik.

Genom herpes virusa sastoji se od 60-120 gena te kodira za najmanje 100 različitih proteina. Genom HSV-1 podijeljen je na dva jedinstvena segmenta koji se nazivaju jedinstvena dugačka domena (engl. *Unique Long Region, UL*) i jedinstvena kratka domena (engl. *Unique Short Region, Us*). UL i Us domene omeđene su terminalnim ponovljenim sekvencama. Duga terminalna ponavljajuća domena (engl. *Long Terminal Repeat Region, TRL*) nalazi se na kraju UL domene, dok se kratka terminalna ponavljajuća domena (engl. *Short Terminal Repeat Region, TRs*) nalazi na kraju Us domene. UL i Us domenu razdvajaju duge ponavljajuće internalne domene (engl. *Long Inverted Internal Repeat Region, IRL*) i kratke ponavljajuće internalne domene (engl. *Short Inverted Internal Repeat Region, IRs*) (Slika 2) (10).



Slika 2. Schematski prikaz genoma HSV-1. HSV genom sadrži dvije jedinstvene domene: dugačku (engl. *Unique Long Region, UL*) i kratku (engl. *Unique Short Region, Us*). UL domena nalazi se između duge terminalne domene (engl. *Long Terminal Repeat Region, TRL*) i duge ponavljajuće internalne domene (engl. *Long Inverted Internal Repeat Region, IRL*), dok se Us domena nalazi između kratke terminalne domene (engl. *Short Terminal Repeat Region, TRs*) i ponavljajuće internalne domene (engl. *Short Inverted Internal Repeat Region, IRs*). Izrađeno u Biorender.

1.1.2. HSV-1 proteini rane i kasne infekcije

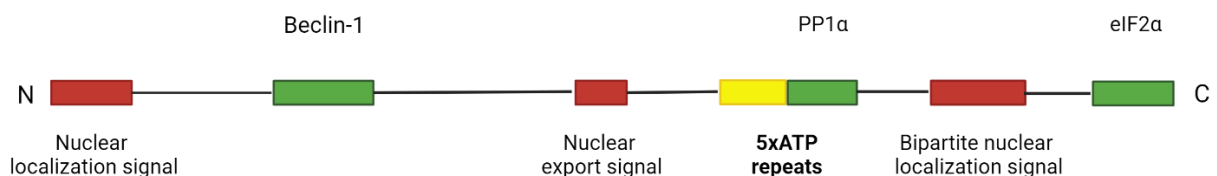
Replikacijski ciklus HSV-1 podijeljen je u dvije različite faze: latencija i produktivni ili litički ciklus. Tijekom latencije, ne dolazi do aktivne proizvodnje virusa te je vrlo mali broj gena ekspresiran. Prilikom odgovarajućeg podražaja, produktivni ciklus HSV-1 se aktivira pri čemu dolazi do stvaranja novih viriona (11). Virus upravlja vremenski reguliranom kaskadom ekspresije gena koja se može podijeliti u 3 grupe: neposredne rane (engl. *Immediate-early, IE* ili α), rane (engl. *Early, E* ili β) i kasne (engl. *Late, L* ili γ) gene. α geni odgovorni su za sintezu različitih virusnih regulatornih proteina poput ICP0 (engl. *Infected cell protein, ICP*), ICP4 i ICP27, uključenih u kontrolu transkripcije β gena (12). Produkti virusnih β gena potrebni su za: naknadnu replikaciju virusnog genoma; ekspresiju γ virusnih gena; te citoplazmatsko nakupljanje nekih od ranih i kasnih virusnih glasničkih RNA (engl. *messenger RNA, mRNA*) (11). Slijedeći virusnu DNA replikaciju, γ geni se prepisuju što u konačnici dovodi do strukturiranja i otpuštanja infektivnih čestica. γ geni odgovorni su za sintezu strukturnih proteina poput glikoproteina C (gC), te faktora neurovirulencije ICP34.5. Proteini kasne infekcije odgovorni su za suzbijanje antivirusnog odgovora domaćina tijekom virusne infekcije (13).

1.2. ICP34.5

HSV-1 protein ICP34.5, je glavni faktor neurovirulencije koji ima ključnu ulogu u virusnoj replikaciji i odgovoru domaćina na virusnu infekciju. ICP34.5 je visoko dinamičan protein koji se kreće između jezgre, jezgrice i citoplazme stoga je njegova funkcija ovisna o staničnom položaju. Tijekom rane HSV-1 infekcije, protein se većinom nalazi u jezgri, dok nakon 8-12h infekcije, dolazi do akumuliranja proteina u citoplazmi (14). Protein ICP34.5 kodiran je HSV-1 i HSV-2 genom γ 134.5, poznatim i kao RL1.

ICP34.5 sastoji se od 248 aminokiselina i sadrži tri domene: amino-terminalna domena (N), regija povezanosti s ATP ponavljanjima (Ala-Thr-Pro) i karboksil-terminalna domena (C) (Slika 3) (15).

Funkcija amino-terminalne domene uključena je u kontrolu signalizacije posredovane Tank vezujućom kinazom 1 (engl. *Tank-binding kinase 1, TBK1*) te je povezana s autofagijom. Regija povezanosti (engl. *Linker Region*), s različitim brojem ponavljanja ATP, može utjecati na lokalizaciju proteina. S druge strane, karboksil-terminalna domena je niz od 84 aminokiseline koji sadrži konsenzusni vezni motiv (R/KVXF) za protein fosfatazu 1 (engl. *Protein Phosphatase 1, PP1*) (15). Zatim slijedi dio bogat aminokiselinama Ala-Arg (Alanin-Arginin) koji je visoko homologan karboksil-terminalnoj regiji sisavaca za zaustavljanje rasta i oštećenje DNA proteina 34 (engl. *Growth arrest and DNA damage-inducible gene 34, GADD34*) i mijeloidnoj diferencijaciji proteina primarnog odgovora MyD116. Ovi proteini su strukturno srodni te su njihove odgovarajuće domene zamjenjive s C-terminalom domenom ICP34.5 u zaraženim stanicama. GADD34 regrutira PP1 za defosforilaciju eukariotskog faktora inicijacije translacije α (engl. *Eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α*) i na taj način omogućuje sintezu virusnih proteina (15,16).



Slika 3. Schematski prikaz domena ICP34.5. HSV-1 ICP34.5 je protein koji se sastoji od 248 aminokiselina koje se dijele u 3 glavne domene: amino i karboksil terminalna domena te vezujuća domena od 5 ATP ponavljanja. N terminalna domena ICP34.5 sadrži signale za nuklearnu lokalizaciju i eksport dok C terminalna domena obuhvaća samo

signal za nuklearnu lokalizaciju. Beclin-1-vezujuća domena (engl. *Beclin 1 Binding Domain, BBD*) je dio N terminalnog kraja, a PP1a i eIF2a vezujuće domene, sastavni su dio C terminalnog kraja. Slika preuzeta i prilagođena iz Ripa I. *et al*, 2022.

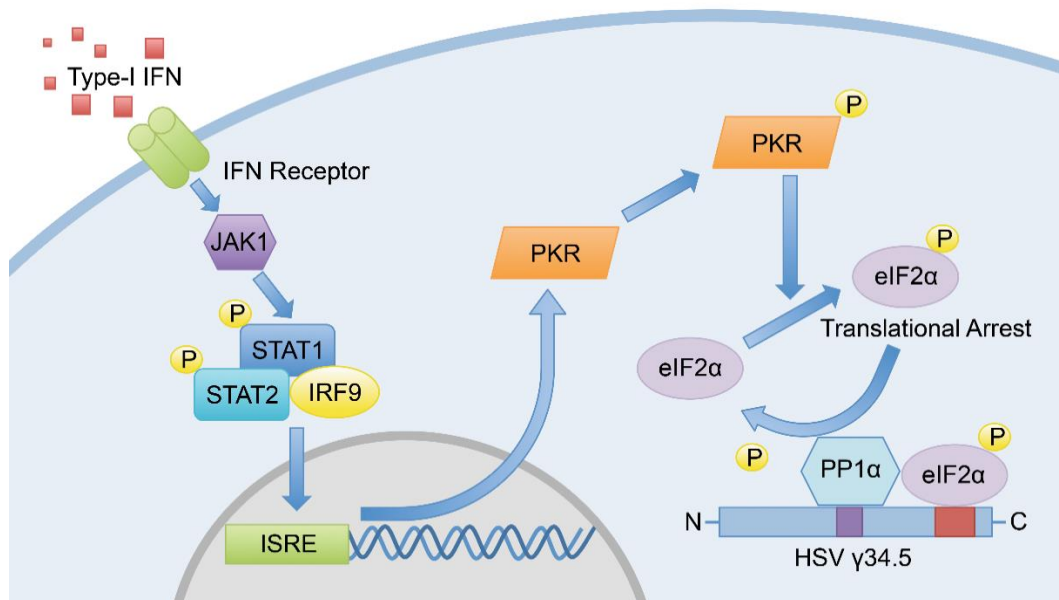
1.2.1. Funkcija ICP34.5

Mnogi virusi razvili su strategije za suzbijanje antivirusnog odgovora određenih signalnih puteva. Djelovanje proteina ICP34.5, utječe na virusni odgovor domaćina. Funkcije ICP34.5 proteina povezane su s domenama koje utječu na funkciju proteina zasebno ili zajedničkim djelovanjem. Neke od glavnih funkcija ICP34.5 proteina su inhibicija transkripcijskog faktora regulacije interferona 3 (engl. *Interferon Regulatory Factor 3, IRF3*) i protein kinaze R (PKR), autofagija povezana s Beclin-1 domenom te utjecaj na sazrijevanje dendritičkih stanica.

1.2.1.1. Inhibicija IRF3 i PKR signalnog puta

Jedan od najranijih odgovora na virusnu infekciju je odgovor interferona tipa I (IFN I). Tijekom virusne infekcije dolazi do aktivacije Tank vezujuće kinaze 1 (TBK1), koja se fosforilira i aktivira IRF3. Fosforilirani IRF3 se translocira u jezgru i pojačava transkripciju IFN I i gena stimuliranih interferonom (engl. *Interferon-stimulated genes, ISGs*) vezanjem na promotore odgovora stimuliranog interferonom (engl. *Interferon-stimulated response element, ISRE*). Lučenje IFN I aktivira IFN I receptore te inducira antivirusno stanje u stanici (17). ICP34.5 sprječava indukciju IFN I tako što se veže N terminalnom domenom na TBK1. Na taj način, ICP34.5 postaje kompetitivni inhibitor IRF3 te u konačnici inhibira TBK1 posredovanu fosforilaciju IRF3 (15).

Osim toga, virusna dvolančana RNA (engl. *double stranded RNA*, *dsRNA*) aktivira dsRNA-ovisnu PKR. Tijekom infekcije, PKR se autofosforilira i utječe na fosforilaciju eIF2 α čime se zaustavlja translacija virusne mRNA. Kako bi se izbjegao ovakav odgovor domaćina, HSV-1 C-terminalna domena proteina ICP34.5, veže se i preusmjerava vezanje PP1 α na eIF2 α , pri čemu dolazi do defosforilacije eIF2 α i inhibicije PKR signalnog puta (Slika 4). Isto tako, C-terminalna domena ICP34.5 dijeli sekvencu s prethodno spomenutim GADD34 koji djeluje kao regulatorna podjedinica PP1 α za usmjeravanje PP1 α na eIF2 α tijekom razdoblja stresa ER i odgovora na pogrešno smatanje proteina (15,18).



Slika 4. Schematski prikaz inhibicije signalnog puta PKR putem ICP34.5 proteina. Tijekom virusne infekcije, IFN receptori stanice domaćina reagiraju na IFN I pri čemu dolazi do aktiviranja interferon stimuliranih gena (ISG), među kojima je i protein kinaza R (PKR). Kada PKR prepozna dsRNA dolazi do autofosforilacije te fosforilacije eukariotskog faktora inicijacije translacije α (eIF2 α). Fosforilirani eIF2 α dovodi do translacijskog bloka i inhibicije sinteze virusnih proteina. Međutim, u trenutku vezanja ICP34.5 na fosfatazu PP1 α , dolazi do

defosforilacije eIF2 α i obnavljanja virusne replikacije. Slika preuzeta iz Douglas R. Wilcox *et al*, 2016.

1.2.1.2. Inhibicija autofagije

Autofagija je stanični proces kojim se unutarstanični patogeni i proteini razgrađuju u dvomembranskom autofagosomu prilikom izlaganja staničnom stresu, poput nedostatka nutrijenta, oksidativnog stresa, prisutnosti pogrešno smotanih proteina ili infekcije patogena. Autofagija je stimulirana kako bi poboljšala metaboličku adaptaciju i stanično preživljenje (19). Ovaj proces je važan za kontrolu virusne replikacije nekoliko neurotropnih virusa, uključujući HSV-1, u živčanom sustavu.

IFN tip I pojačava PKR ekspresiju pri čemu može doći do indukcije autofagije tijekom neuralne infekcije. Da bi došlo do uspješne replikacije u mozgu, HSV-1 ICP34.5 se veže na Beclin 1 vezujuću domenu (engl. *Beclin Binding Domain, BBD*) i inhibira protein koji inducira autofagiju, Beclin 1 (20).

1.2.1.3. Utjecaj na sazrijevanje dendritičkih stanica

Nezrele dendritičke stanice (engl. *Dendritic Cells, DCs*) koje su prisutne u većini perifernih tkiva, imaju mogućnost obrade virusnih antigena. Tijekom tog procesa, DCs migriraju u limfne čvorove, sazrijevaju i prezentiraju antigene CD8⁺T stanicama. DCs otpuštaju proupalne citokine poput interleukina 12 (IL-12), faktora nekroze tumora alfa (TNF α), IFN I te IFN α i IFN β koji sudjeluju u sazrijevanju i aktiviranju DCs (21).

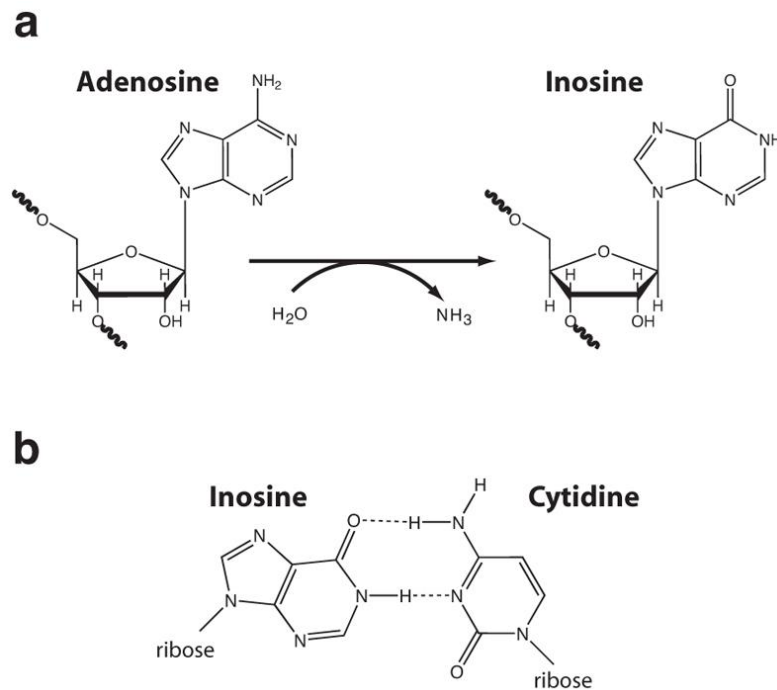
Tijekom HSV-1 infekcije, protein ICP34.5 sprječava sazrijevanje DCs te zajedničkim djelovanjem amino i karboksil terminalne domene utječe na T staničnu aktivaciju (15). Mehanizam pomoću kojeg ICP34.5 utječe na sazrijevanje DCs, potaknut je defosforilacijom I κ B (engl. *Inhibitor of nuclear*

factor kappa B, IκB) kinaze (22). N-terminalna domena ICP34.5 veže se na protein IKKα/β dok C-terminalna domena utječe na PP1α. Ovakav multiproteinski kompleks defosforilira IκB kinazu kako bi se prevenirala aktivacija nuklearnog faktora κB (engl. *Nuclear Factor Kappa B, NF-κB*), transkripcijskog faktora koji regulira ekspresiju gena uključenih u imunosti odgovor, upalu i stanično preživljenje (22).

1.3. ADAR proteini

Adenzin deaminaze koje djeluju na RNA, poznati kao ADAR proteini (engl. *Adenosine Deaminases Acting on RNA, ADARs*), su enzimi koji deaminiraju adenzin (A) do inozina (I) u dsRNA (Slika 5). Ovakva reakcija naziva se A-I editiranje (engl. *A-I Editing*) (23).

A-I editiranje može se podijeliti u dvije skupine: visoko selektivno, na mjestu s deaminacijom adenozina koja se pojavljuje na jednom ili vrlo malo specifičnih A u RNA; i alternativno, gdje višestruki A mogu biti deaminirani u RNA supstratima s gotovo savršenom dvostrukom strukturom (24). Većina A-I editiranih mjesta se pojavljuje u ponavljajućoj nekodirajućoj sekvenci kao što je Alu sekvenca u humanom transkriptomu (25).



Slika 5. Deaminacija adenoza u inozin pomoću ADAR proteina. a) Hidrolitička deaminacija pretvara adenzin u inozin. b) Inozin se spaja s bazama s citidinom i stoga ga većina staničnih procesa čita kao gvanin. Slika preuzeta iz Pierre B. *et al*, 2012.

U genomu sisavaca postoje tri ADAR lokusa koji kodiraju za proteine: ADAR1, koji ima dvije izoforme, ADAR1-p110 i ADAR1-p150; ADAR2; i ADAR3. ADAR1 i ADAR2 su enzimski aktivni proteini koji deaminiraju virusne i stanične dsRNAs, dok ADAR3 protein nema poznatu katalitičku aktivnost (26). U dosadašnjim istraživanjima, dokazano je da je više od polovice editiranih mjesta, editirano od strane izoforme proteina ADAR1-150, usporedbi s ostalim ADAR proteinima (10).

Mutacije gena koji kodiraju za ADAR proteine, povezane su s razvojem bolesti poput Aicardi-Goutieres sindroma (AGS), Dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH) te razvojem karcinoma (27).

1.3.1. ADAR1 protein

ADAR1 gen nalazi se na humanom kromosomu 1q21 i mišjem 3F2 kromosomu. Postoje dvije proteinske izoforme ADAR1: IFN inducibilan ADAR1-p150; i konstitutivno ekspresiran ADAR1-p110 (24).

Okvir čitanja (engl. *Open Reading Frame, ORF*) humane ADAR1 komplementarne DNA (engl. *Complementary DNA, cDNA*) iznosi 1226 aminokiselina (25). Alternativni promotori, od kojih je samo jedan IFN inducibilan, potiču ekspresiju humanog i mišjeg ADAR1 gena. IFN inducibilni ADAR1 promotor posjeduje ISRE, karakterističan IFN tip I reguliran gen i element sličan uzvodno kinazno-konsenzusnoj sekvenci (engl. *Upstream Kinase-consensus Sequence, KCS-like*) (24).

Zbog alternativnog splicing-a, nastaju jedinstveni transkripti koji kodiraju IFN-inducibilni p150 protein. ADAR1-p150 protein je ekstenzija N-terminalnog kraja p110 proteina koji se nalazi u jezgri i citoplazmi, dok se ADAR1-p110 nalazi predominantno u jezgri (28). ADAR1-p150 i p-110 imaju tri kopije prototipa dsRNA-vezujuće, funkcionalno najvažnije domene: RI, RII i RIII. C-terminalna deaminazna aktivnost je prisutna u oba proteina, međutim, ADAR1 proteini se razlikuju u N-terminalnoj regiji (28,29). ADAR1-p150 sadrži dvije kopije Z-DNA vezujuće domene, Z α i Z β , dok ADAR1-p110 protein posjeduje isključivo Z β domenu (Slika 7) (29).

1.3.1.1. Funkcija ADAR1 proteina

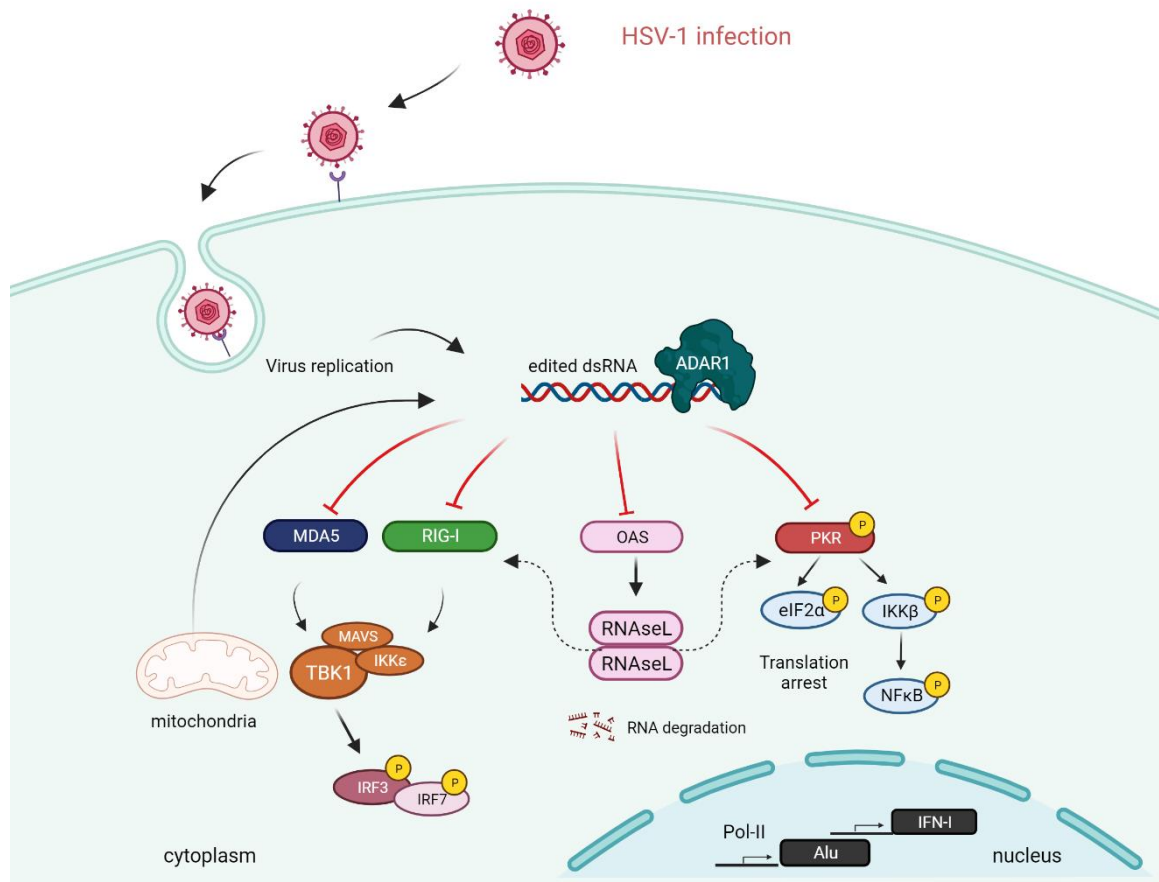
Urođeni imunološki sustav ima sposobnost prepoznavanja molekularnih obrazaca (engl. *Molecular Patterns*) koji nastaju kao posljedica virusne replikacije. Takvi obrasci nazivaju se molekularni obrasci povezani s patogenom (engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs*) te ih prepoznaju posebni receptori za prepoznavanje obrazaca (engl. *Pattern Recognition Receptors, PRR*). Replikacija RNA i dsRNA virusa stvara dugo,

savršeno sparivanje baza dsRNA u citoplazmi koje senzorni sustavi prepoznaju kao PAMPs (30).

Kada je u pitanju urođena imunost, ADAR1 se pokazao kao jedan od glavnih proteina koji utječe na RNA editiranje. Song et.al pokazali su da se ADAR1 ponaša kao regulator 3 glavna senzorna puta: RIG-I-like receptor (RLR) signalni put, protein kinaza R (PKR) signalni put i oligoadenilat sintetaza (OAS)-RNaza L signalni put (31).

Dvije glavne molekule za prepoznavanje citosolne dsRNA uključuju gen 1 inducibilan retioničnom kiselinom (RIG-I) i gen 5 povezan s diferencijacijom melanoma (engl. *Melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5*) (32). Vezanjem na dsRNA, ovi proteini regrutiraju mitohondrijski antivirusni signalni protein (engl. *Mitochondrial Antiviral-signaling Protein, MAVS*) i IKK-povezane kinaze. Zbog toga dolazi do fosforilacije IRF3 i 7 (31). Potom, transkripcijski faktori odlaze u jezgru gdje aktiviraju IFN I promotore pri čemu dolazi do sekrecije IFN. Signalizacija receptora IFN, inducira antivirusno stanje tako što regulira ISGs. Ovi geni kodiraju za proteine s direktno antivirusnim funkcijama, kao što su PKR, OAS1 i RNaza L (31).

IFN inducibilna ekspresija dsRNA aktivirane PKR, inhibira replikaciju velikog broja virusa. Kada je stanica izložena dsRNA PKR se aktivira, autofosforilira i potiče daljnju fosforilaciju eIF2 α . Nakon što je eIF2 α fosforiliran, dolazi do sprječavanja translacije virusne mRNA (33). Osim što dovodi do aktivacije PKR, dsRNA utječe i na IFN inducibilan oligoadenilat sintetazni (OAS)-RNazni L signalni put. Jednom kada se OAS aktivira, dolazi do translacijskog bloka i prevencije virusne replikacije (Slika 6) (34).



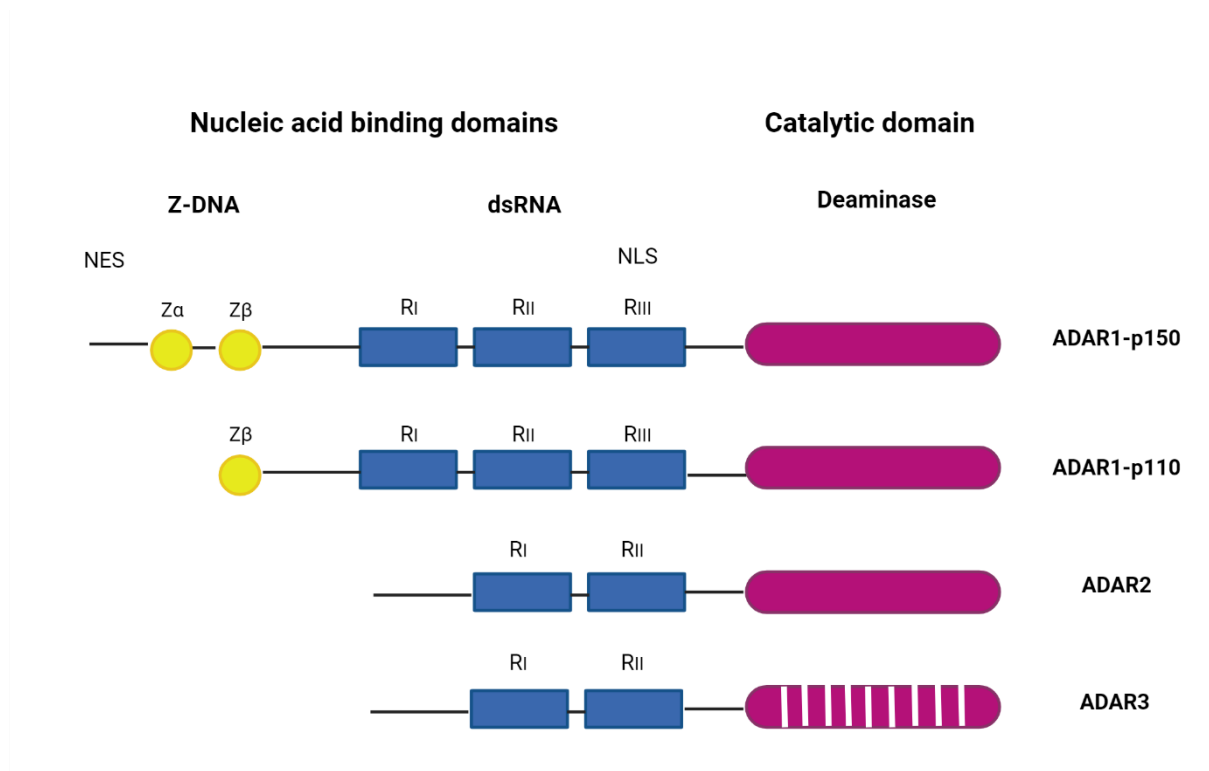
Slika 6. Schematski prikaz utjecaja ADAR1 proteina na antivirusne signalne puteve aktivirane dsRNA. Vezanje ADAR1 na proširene duplekse dsRNA, sprječava pokretanje receptora za prepoznavanje uzoraka proteina povezanog s diferencijacijom melanoma 5 (MDA5), protein kinaze R (PKR) i oligoadenilat sintetaze (OAS), koji u konačnici dovode do antivirusnih mehanizama indukcije interferona, zaustavljanja translacije i apoptoze. Izrađeno u Biorender.

1.3.2. ADAR2 i ADAR3 protein

ADAR2 gen je pronađen u humanom kromosomu 21q22 i mišjem kromosomu 10C1 (24). Slično kao i ADAR1, ADAR2 je ekspresiran u većini tkiva u jezgri, ali najviše je zastupljen u mozgu (32). ADAR2 također prolazi

kroz proces splicing-a, a raznolikost transkripata pokazuje da postoje izoforme ADAR2 proteina s potencijalno različitim funkcijama. ADAR2 posjeduje dvije kopije R domene na N-terminalnom kraju i deaminaznu katalitičku domenu na C-terminalnom kraju (Slika 7). U odnosu na ADAR1, ADAR2 nije reguliran pomoću IFN (25). ADAR2 je fosforiliran pomoću kinaze C na dva mjesta između dsRNA-vezujućih domena, s211 i s216. Fosforilacija ovih mjesta utječe na specifično editiranje micro-RNA (miR)-200. ADAR2 je u velikoj mjeri odgovoran za visoko selektirano A-I editiranje koje je promatrano u stanicama sisavaca (23,25).

S druge strane ADAR3 protein ponaša se drugačije u odnosu na ostale ADAR proteine. Glavna karakteristika ADAR3 proteina je da nema enzimsku aktivnost te je ekspresija proteina ograničena na živčani sustav, posebno u regijama hipokampusa i amigdale (32,33). Humani ADAR3 protein sastoji se od 739 aminokiseline, uključujući dvije kopije R domene u N-terminalnoj regiji i deaminaznu C-terminalnu domenu (Slika 7) (25). Iako ne posjeduje enzimsku aktivnost editiranja, ADAR3 se smatra inhibitorom ADAR1 i ADAR2 enzima koji se ponašaju kao dimeri te su podložni dominantnim negativnim učincima (35).



Slika 7. Schematski prikaz domena ADAR1, ADAR2 i ADAR3

proteina. Deaminazno katalitička domena je prisutna na C terminalnom kraju (ljubičasto). Ponavljajuće dsRNA-vezujuće domene (plavo) označene su RI, RII i RIII, na N terminalnoj regiji nalaze se Z-DNA vezujuće domene (žuto), Zα i Zβ. NES- nuklearni izlazni signal, NLS- nuklearni lokalizacijski signal. Izrađeno u Biorender.

1.4. Integrirani odgovor na stres

Eukariotske stanice odgovaraju na unutarnji i vanjski stres koji može uključivati deprivaciju glukoze ili aminokiselina, hipoksiju ili virusnu infekciju, pri tom aktivirajući integrirani odgovor na stres (engl. *Integrated Stress Response, ISR*) (36). ISR je stanična signalna mreža koja prepoznaje stanični stres i privremeno zaustavlja globalnu sintezu proteina pri tom dopuštajući translaciju nekoliko odabranih mRNA koje potiču stanični oporavak i preživljenje (37).

Glavni odgovor ISR signalne mreže na stanični stres je stvaranje stres granula (engl. *Stress Granules, SGs*), dinamičkih agregata koji sadrže mRNA i brojne druge proteine poput TIA-1 i G3BP-1, te dolazi do njihovog nakupljanja unutar citoplazme (36,38,39). Nastajanje SGs ovisi o eIF2. eIF2 je heterotrimerna GTPaza (gvanzoin-trifosfat) sastavljena od α , β i γ podjedinica, koja može vezati GTP i inicijacijski transportni RNA (tRNA) metionin stvarajući trojni kompleks (engl. *Ternary Complex, TC*) (40). Nakon hidrolize GTP-a, eIF2-GDP se oslobađa kao binarni kompleks iz ribosoma (37). Izmjena GDP-a i GTP omogućuje novi ciklus inicijacije translacije te se odvija pomoću faktora izmjene namjenskog nukleotida, faktorom inicijacije translacije 2β (eIF2 β) (36).

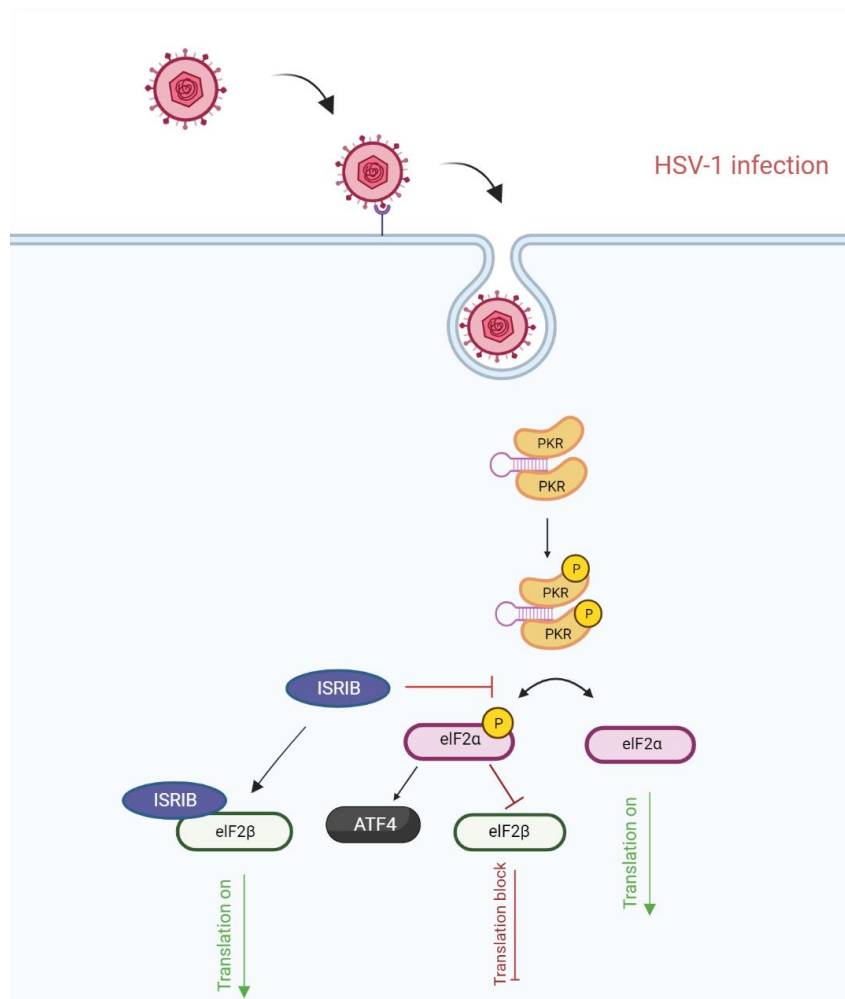
Kao odgovor na stres, aktiviraju se eIF2 kinaze i fosforiliraju konzervirani Ser-51 ostatak u eIF2 α . Poznate su 4 eIF2 α kinaze: protein kinaza R (PKR) koja se aktivira prepoznavanjem strane RNA; PKR slična kinaza endoplazmatskog retikuluma (PERK), koja odgovara na nakupljanje pogrešno smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu (ER); GCN2 (engl. *General Control Derepressible 2*), koja signalizira deprivaciju aminokiselina; i hem-regulirani inhibitor (eng. *Hem-regulated inhibitor, HRI*) koji prepoznaje nedostatak hema (41). Fosforilacijom, eIF2 α prelazi iz substrata u kompetitivni inhibitor eIF2 β , stabilizirajući njegovu vezu s GDP-om. Na ovaj način dolazi do zaustavljanja sinteze proteina i nakupljanja kompleksa inicijacije translacije u SGs dok se istovremeno pojačava translacija nekoliko odabranih mRNA koje sadrže uzvodne otvorene okvire čitanja i kodiraju faktore koji reagiraju na stres (42).

1.4.1. ISRIB-inhibitorna molekula

Nedavno je otkriven farmakološki inhibitor odgovora na integrirani stres ISRIB (engl. *Integrated Stress Response Inhibitor, ISRIB*). ISRIB sprječava nastanak SGs u prisutnosti p-eIF2 α tako što se veže na eIF2 β pri čemu se zaustavlja sinteza proteina aktivirajućeg faktora transkripcije 4 (engl. *Activating transcription factor 4, ATF4*) i omogućuje nesmetanu translaciju virusnih proteina (Slika 8) (42).

ATF4 je transkripcijski faktor koji poboljšava transkripcijsku ekspresiju gena uključenih u metabolizam aminokiselina i rezistencije na oksidativni stres. Ekspresija ATF4 regulirana je transkripcijski, translacijski (putem PERK signalnog puta), i posttranslacijskom fosforilacijom (43). Osim toga, ATF4 ima sposobnost induciranja transkripcije još jednog transkripcijskog faktora CHOP (engl. *C/EBP Homologous Protein*). Zajedno s CHOP faktorom, ATF4 uzrokuje translacijsku blokadu proteina (43,44).

Sposobnost ISRIB-a da obnovi translaciju proteina nakon aktivacije ISR-a, prikazuje ga kao obećavajuću metodu za modulaciju neuroloških procesa: promjenu kognitivnih nedostataka nakon ozljede mozga; zaštitu od neurodegeneracije izazvane prionima; i sprječavanje nastanka metastaza određenih karcinoma (42).



Slika 8. Schematski prikaz djelovanja ISRIB molekule tijekom HSV-1 infekcije. dsRNA aktivira PKR pri čemu dolazi do autofosforilacije i fosforilacije eIF2α. Fosforilirani eIF2α postaje inhibitor za eIF2β te dolazi do sinteze proteina ATF4 pri čemu dolazi do blokiranja translacije virusne mRNA. ISRIB molekula zaustavlja fosforilaciju eIF2α i stvara aktivni kompleks s eIF2β te dolazi do sinteze virusnih proteina. Izrađeno u Biorender.

2. Cilj rada

Virusna replikacija je izrazito složen proces koji ovisi o mehanizmu sinteze proteina stanice domaćina. Brojni proteini domaćina, kao odgovor imunosnog sustava, nastoje inhibirati invaziju virusa.

Glavni cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj proteina ADAR1 tijekom HSV-1 infekcije te proteina ICP34.5 i inhibitorne molekule ISRIB u odsustvu ADAR1 proteina. Promatrao se učinak naknadno dodane ISRIB inhibitorne molekule na mehanizam kinaze PKR koja regulira proces sinteze proteina fosforilacijom eIF2 α i tako utječe na replikaciju HSV-1. Isto tako, ispitali smo utjecaj faktora neurovirulencije ICP34.5 na HSV-1 virusnu replikaciju obzirom da je prethodno zabilježena provirusna uloga ovog proteina. Za potrebe rada korištene su metode transfekcije, Western Blot analize te virusne titracije.

Specifični ciljevi rada:

a) ISRIB eksperiment

- 1) Tretiranje HEK293A stanica ISRIB inhibitornom molekulom u kontrolnoj i „knock-out“ (KO) ADAR1 staničnoj liniji
- 2) Detekcija ekspresije virusnih proteina gC i ICP4 te fosforiliranih p-PKR i p-eIF2 α nakon tretiranja s ISRIB-om
- 3) Usporedba virusne replikacije između netretiranih te ISRIB tretiranih uzoraka u kontrolnoj i KO ADAR1 staničnoj liniji

b) ICP34.5 eksperiment

- 1) Transfekcija HEK293T stanica s ICP34.5, pc-DNA3 i GFP (engl. *Green Fluorescent Protein*) plazmidima u kontrolnoj i KO ADAR1 staničnoj liniji
- 2) Detekcija ekspresije virusnih proteina ICP34.5, ICP4 i gC
- 3) Usporedba virusne replikacije između transficiranih ICP34.5 i netransficiranih uzoraka u kontrolnoj i KO ADAR1 staničnoj liniji

3. Materijali i metode

3.1. Stanične linije, bakterije i virusi

Humane embrionalne stanice bubrega 293 (HEK293A i HEK293T; engl. *Human Embryonic Kidney Cells*) korištene su za transfekciju i Western Blot (WB) analizu dok su stanice bubrega afričkog zelenog majmuna (engl. *Kidney epithelial African green monkey cells, Vero cells*) korištene za titraciju. Stanice su uzgajane u DMEM mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, Pan Biotech*) u koji je prethodno dodan 10% fetalni goveđi serum (engl. *Fetal bovine serum, FBS*) te antibiotici penicilin i streptomycin. Stanice su održavane u Petrijevim zdjelicama (promjer 10 cm) u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂.

Pasažiranje stanica provedeno je svakih 3-5 dana pri čemu je korišteno 5 mL DPBS (engl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline, Pan Biotech*) za ispiranje te 2 mL tripsina 2x (*Gibco*) kako bi se stanice odvojile od podloge.

Bakterije *Escherichia Coli* pohranjene na -80 °C, korištene su za transfekciju. Virus Herpes Simplex 1, soj KOS dobiven je ljubaznošću prof. D.M. Coena, Harvard Medical School.

3.2. Plazmidi

Plazmid ICP34.5 dobiven je kloniranjem PCR produkta umnoženog na genomu HSV-1 soja KOS (ljubaznošću dr. Igor Juraka) u pCDNA3 (Clontech). Gen ICP34.5 fuzioniran je s biljekom FLAG na N-terminalnom kraju proteina.

3.3. Izolacija plazmidne DNA

Prilikom izolacije plazmidne DNA, korišteni su uzorci FLAG ICP34.5, PC-DNA3 te GFP koji su pohranjeni na -80 °C. Pomoću pipete od 1 mL, uzorci bakterija uzeti su s površine ependorfice i dodani u prethodno pripremljene

epruvete u kojima se nalazilo 2 mL LB (engl. *Luria Broth, LB*) medija i 2 μ L (1:1000) određenog antibiotika. Antibiotik ampicilin korišten je za izolaciju plazmida FLAG ICP34.5 i PC-DNA3, dok je kanomicin korišten za izolaciju pEGFPN1 plazmida. Pripremljene otopine ostavljene su u tresilici za bakterije preko noći na 37°C na 225 rpm. Sljedeći dan, bakterijske kulture su prenesene u tikvice od 250 mL te je dodano 100 mL LB medija i 100 μ L odgovarajućeg antibiotika. Kulture su ponovno ostavljene u tresilici preko noći nakon čega su uzorci prebačeni u Falcon epruvetu od 50 mL i centrifugirani 20 min na 3700 rpm na 4°C . Supernatant je uklonjen, a iz peleta je izolirana plazmidna DNA.

Za izolaciju plazmidne DNA korišten je *NucleoBond Xtra Midi kit*. U prvom koraku pelet je resuspendiran u 8 mL pufera za resuspenziju S1 (engl. *Buffer RES*) te je dodano 8 mL pufera za lizu S2 nakon čega je otopina invertirana 4-5x puta. Uzorak je centrifugiran dodatno 10 minuta na 3700 rpm na 4°C nakon čega se odvojila prozirna otopina, koja sadrži plazmidnu DNA, od staničnog debrisa. Nakon odvajanja plazmidne DNA na DNA vezujućoj koloni, na stijenke kolone dodano je 12 mL pufera za ispiranje (engl. *Equilibration Buffer, EQU*). Zatim je na kolonu dodano 8 mL pufera za neutralizaciju (engl. *Neutralization Buffer, NEU*) uz nježno invertiranje 4-5x dok nije u potpunosti nestalo plavo obojenje. U sljedećem koraku uslijedilo je prvo ispiranje stijenke kolone s 5 mL EQU pufera te uklanjanje filtera. Drugo ispiranje s 8 mL pufera WASH, odvijalo se na koloni bez filtera. Potom je kolona prebačena u novu Falcon epruvetu od 15 mL te je dodano 5 mL pufera za eluciju (engl. *Buffer Elution, ELU*). Kako bi se precipitirala eluirana plazmidna DNA, dodano je 3.5 mL izopropanola (na sobnoj temperaturi) nakon čega je otopina vorteksirana te centrifugirana na 10 000 rpm 30 minuta na 4°C. Supernatant je odbačen, a u bijeli pelet je dodano 2 mL 70% etanola pri čemu je došlo do obezbojenja. Nakon posljednjeg ispiranja, etanol je uklonjen, a pelet ostavljen da se suši preko noći.

3.3. Određivanje koncentracije izolirane DNA

Za određivanje koncentracije izolirane DNA korišten je uređaj *BioDrop DUO* spektrometar. Uzorci su prethodno otopljeni u 50 μL ddH₂O (destilirana voda) i dobro resuspendirani. Kao referentni uzorak koristila se ddH₂O. Na predviđeno mjesto na površini detektora spektrofotometra, nanesen je 1 μL svakog uzorka. Koncentracija DNA izražena je u $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.4. Transfekcija HEK293A stanica s ICP34.5, pC-DNA3 i GFP plazmidima

Za potrebe transfekcije korištene su kontrolne stanice (engl. *Parental cell line, PAR*) i KO ADAR1 HEK293A stanice koje su prethodno nasadene u Petrijevoj zdjelici (10 cm). Medij iz staničnih kultura je odbačen te su KO i PAR stanične linije isprane s 5 mL DPBS-a. Nakon toga, dodan je 1 mL tripsina 2x. Stanice su inkubirane na 5 minuta te je dodano 5 mL DMEM medija u kojem su resuspendirane. Stanice su brojane u *Neubauer-ovoj komorici* u prva dva kvadranta te je uzeta srednja vrijednost broja stanica po mL. U ploči sa 6 jažica, u kojoj je prethodno nanesen BD Matrigel™ (*Becton Dickinson*) kako bi se stanice bolje fiksirale, nasadeno je 500 000 stanica po jažici. U tri jažice nalazila se kontrolna, a u preostale tri KO ADAR1 stanična linija. Nakon nasadivanja na ploču, stanice su pohranjene u inkubatoru na 37°C na 5% CO₂ preko noći.

Za transfekciju je korišten Lipofectamine® 2000 protokol (*Invitrogen by Thermo Fischer Scientific*). Ukupna koncentracija DNA po jažici iznosila je 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ po plazmidu. Naknadno je dodano 300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ plazmida GFP u uzorke s ICP34.5 i pC-DNA3 plazmidom. U DNA je dodan opti-MEM® medij (*Gibco 1x*) tako da ukupna količina svakog uzorka iznosi 50 μL . Otopina DNA je pomiješana sa otopinom koja u sebi sadrži 2 μL lipofektamina i 48

μL opti-MEM medija. Uzorci koji sadrže DNA i lipofektamin inkubirani su na sobnoj temperaturi 20 minuta.

Prije transfekcije, stanicama je promijenjen medij i dodano je 400 μL svježeg DMEM medija. Zbog osjetljivosti stanične linije, plazmidi su dodani ravnomjerno, tehnikom nakapavanja te su stanice inkubirane 24 h na 37 °C na 5% CO₂.

3.5. Infekcija stanica s HSV-1

Uzorci za analizu dobiveni su ljubaznošću dr. Mie Cesarec i dr. Igor Juraka. Ukratko, stanice NNN su inficirane HSV-1 pri određenoj višestrukoj infekciji (engl. *Multiplicity Of Infection, MOI*) i uzorci za analizu sakupljeni su u naznačenim vremenima nakon infekcije.

3.6. Izolacija proteina za Western Blot analizu

Transficirani uzorci su sakupljeni 24 h nakon infekcije i centrifugirani na 10 000 rpm, 4°C na 10 minuta. U dobiveni pelet dodano je 60 μL RIPA pufera (engl. *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer, RIPA*) te su uzorci ponovno centrifugirani. U sakupljeni supernatant dodano je 60 μL Laemmli 2x pufera (omjer 1:1). Potom su uzorci zagrijani na 95°C na 6 minuta, centrifugirani i stavljeni na led prije nanošenja na gel za SDS (natrijev dodecilsulfat)-elektroforezu.

Za analizu i ispitivanje djelovanja molekule ISRIB, korištena je ploča s 24 jažice te su u 12 uzoraka nasađene kontrolne stanice, a u preostalih 12 KO ADAR1 HEK293A stanice. U svakoj staničnoj liniji uzorci su bili tretirani s DMSO (1mM STOCK otopina), ISRIB (*Sigma-Aldrich*, 500 nM) inhibitornom molekulom te netretirani (NT). Uzorci su pripremljeni u 4 paralelna uzorka (kvadriplikat) te je svaka jažica sadržavala približno 250 000 stanica. Izolacija proteina provodila se prema istom postupku kao i za transficirane uzorke.

3.7. SDS gel elektroforeza i Western blot analiza

Za SDS-gel elektroforezu korišten je 10% poliakrilamidni gel za razdvajanje (Tablica 1) koji je nanesen između dvaju staklenih ploča te su zaostali mjehurići uklonjeni s izopropanolom. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje (u prosjeku 10 minuta) nadsvođen je gel za sabijanje (Tablica 1) te je umetnut češljic od 10 jažica debljine 1.0 mm prilikom čega se gel polimerizirao dodatnih 10 minuta. Uz pomoć pipete (20-200 μL) jažice su isprane te je nanoseno 20 μL svakog uzorka i 3 μL proteinskog markera (*NEB, broad range*). U kadicu je dodan pufer za elektroforezu 1x (engl. *Running buffer 1x*) i uzorci su razdvajani prvih 30 minuta na 80 V, te preostalih 60 minuta na 110 V.

Tablica 1. Prikaz sastava gela za razdvajanje i gela za sabijanje

Gel za razdvajanje		Gel za sabijanje	
dH ₂ O (destilirana voda)	2,4 mL	dH ₂ O	1,8 mL
poliakrilamid	1,25 mL	poliakrilamid	313 mL
TRIS-HCl pufer (pH 8,8)	1,25 mL	TRIS-HCl pufer (pH 6,8)	315 mL
10% SDS (natrijev dodecilsulfat)	50 μL	10% SDS	25 μL
10% APS (amonijev persulfat)	50 μL	10% APS	25 μL
TEMED (tetrametiletiendiamin)	5 μL	TEMED	2,5 μL
Ukupno:	5 mL	Ukupno	2,48 mL

Nakon razdvajanja proteina, gel s uzorcima je prenesen na nitroceluloznu membranu. Korištena je tzv. „sendvič“ metoda gdje se kazeta za transfer sastoji od spužvica, filter papira i nitrocelulozne membrane na koju je dodan gel s uzorcima. Nakon što je složena kazeta zajedno s ledom i magnetom ostavljena u kadicu, dodan je pufer za transfer 1x. Nakon 60 minuta transfera na 0.35 A i 120 V, nitrocelulozna membrana prenesena je u otopinu *Ponceau S* na dvije minute te je ispirana u ddH₂O.

Membrane su inkubirane 30 minuta u 5% puferu za blokiranje te je uslijedila inkubacija s primarnim protutijelima 24h na 4°C (Tablica 2). Završenom inkubacijom primarnim protutijelima, membrane se ispiru 3x po 10 minuta u TBS-T (*engl. Tris Buffer Saline with Tween, TBS-T*) puferu nakon čega se inkubiraju 90 minuta u sekundarnim protutijelima (Tablica 3). Nakon inkubacije u primarnim i sekundarnim protutijelima, membrane su pohranjene u TBS1x puferu prije detekcije proteina.

Sve korištene otopine i njihov sastav prikazane su u Tablici 4.

Tablica 2. Prikaz korištenih primarnih protutijela

Primarno protutijelo	Proizvođač	Izvor	Razrjeđenje za WB analizu
anti-ADAR1	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
anti-eIF2 α	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
anti-fosfoeIF2 α	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
anti-PKR	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
anti-fosfoPKR	AbCam	Rabbit	1:1000
anti-ICP4	AbCam	Mouse	1:1000
anti-gC	AbCam	Mouse	1:2000
anti-ATF4	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
anti-FLAG	Sigma Aldrich	Rabbit	1:2000
anti-GFP (4B10)	Cell Signaling	Mouse	1:1000
anti-Actin	Millipore	Mouse	1:10000

Tablica 3. Prikaz korištenih sekundarnih protutijela

Sekundarno protutijelo	Proizvođač	Izvor	Razrjeđenje za WB analizu
alpha-mouse	Cell Signaling	Mouse	1:2000
alpha-rabbit	Cell Signaling	Rabbit	1:2000

Tablica 4. Prikaz otopina i sastava otopina

Otopina	Sastav
LB medij	5 g LB praha, 200 mL ddH ₂ O
Pufer za elektroforezu 10x	30,3 g Tris, 144 g glicin, 10 g SDS, ddH ₂ O do 1L
Pufer za elektroforezu 1x	900 mL dH ₂ O , 100 mL pufera za elektroforezu 10x
Transfer pufer 10x	30,3 g Tris , 144 g glicin, 1 L ddH ₂ O
Transfer pufer 1x	700 mL dH ₂ O, 200 mL metanol, 100 mL transfer pufer 10x
TRIS-HCL, pH 8,8	90.83 g Tris baze, 400 mL ddH ₂ O, prilagođen pH na 8,8 pomoću koncentrirane HCl, dopunjeno do 500 mL
TRIS-HCL, pH 6,8	30.25 g Tris baze u 200 mL ddH ₂ O, prilagođen pH na 6,8 pomoću koncentrirane HCl, dopunjeno do 250 mL
10% SDS	5 g SDS u 50 mL, zagrijano na 68 °C zbog topljivosti, prilagođen pH 6,6
10% APS (amonijev persulfat)	2 g APS, 20 mL ddH ₂ O, filter
Ponceau S	2.5 ml octene kiseline, 200 mL H ₂ O, 0,25 g Ponceau S Dopunjeno s H ₂ O do 250 mL
Pufer za blokiranje	2 g mlijeka u prahu, 40 mL TBS 1x
Otopina protutijela	0.5 g mlijeka u prahu, 10 mL TBS 1x, Ab dodano prema određenom razrjeđenju
TBS-10x	88g NaCl, 24 g Tris, ~13 ml HCl do pH 7,6 dopunjeno s ddH ₂ O do 1L
TBS-1x	900 mL dH ₂ O , 100 mL TBS-10x
TBS-T	900 mL dH ₂ O, 100 mL TBS-10x, 500 µL TWEEN-a

3.8. Detekcija proteina na nitroceluloznoj membrani

Za detekciju proteina na membrani korišten je uređaj *BioChem* i smjesa otopina (1:1); Solution A, ECL™ Prime Luminol Enhancer Solution i Solution B (*cytiva, Amersham™*), ECL™ Prime Peroxide Solution; te SuperSignal® West Femto Luminol/Enhancer Solution i SuperSignal® West Femto Stable Peroxide Solution (*Thermo Scientific*). Ovisno o signalu proteina, otopina je nanosena ravnomjerno na membrane koje su se inkubirale otprilike 1 minutu prije nego što je zabilježena slika proteina.

3.9. Plak esej

Vero stanice (približno 150000 stanica po jažici) su nasadene u ploči s 24 jažice te su inkubirane preko noći kako bi se zadržao monosloj sa 100% konfluencijom. Nakon toga, stanice su inkubirane 1 h s 250 µL 10 puta serijski razrijeđenog supernatanta koji sadržavao HSV-1 s naznačenim razrjeđenjima. Nakon sat vremena, infektivni medij je uklonjen i stanicu su prekrivene otopinom metilceluloze. Nakon 3 dana, stanice su fiksirane, koristeći otopinu za fiksiranje (5% metanol, 10% octena kiselina), minimalno 2 sata. Nakon fiksiranja, stanice su isprane s vodom te su obojane s 5% giemsa u PBS-u i inkubirane 2 sata. Prekomjerno obojenje je isprano s vodom i plakovi su prebrojani. Jedinica stvaranja plakova (engl. *Plaque Forming Units, PFU*) je prebrojana prema sljedećoj formuli:

$$\text{PFU/mL} = \text{Broj plakova u jažici} \times 4 \times \text{faktor razrjeđivanja}$$

4. Rezultati

4.1. Replikacija HSV-1 u KO ADAR1 HEK293T stanicama

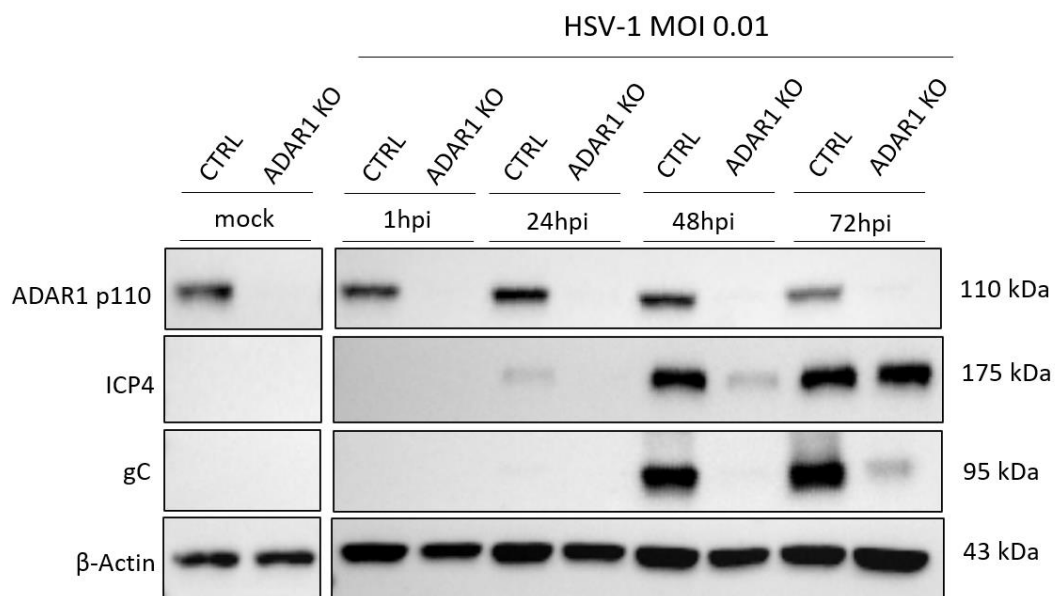
U prethodnim istraživanjima, ispitivao se utjecaj ADAR1 proteina na virusnu replikaciju tijekom HSV-1 infekcije. Kako bi dodatno potvrdili ulogu ADAR1 u virusnoj infekciji, provedena je WB analiza gdje se analizirala ekspresija proteina rane i kasne HSV-1 infekcije. Ukratko, stanice su inficirane pri MOI 0.01, a uzorci za analizu sakupljeni su 1., 24., 48. i 72. sat nakon infekcije (engl. *Hours Post Infection, hpi*) te su uspoređivani neinficirani uzorci (engl. *mock*) i uzorci inficirani s HSV-1 u kontrolnim (*ctrl*) i stanicama s nedostatkom ADAR1 (ADAR KO).

Kako bi smo potvrdili nedostatak ADAR1 proteina u ADAR1 KO stanicama, prvo smo analizirali ADAR1 p110 (veličine 110 kDa). Za detekciju proteina, korišteno je specifično zečje anti-ADAR1p110 protutijelo. WB analizom potvrđeno je prisustvo u *ctrl* uzorcima, dok u KO staničnoj liniji nije detektiran signal. Isto tako, najjači signal prisutan je 24hpi te postepeno slabi tijekom kasnih sati infekcije (Slika 9), što može ukazivati na aktivno uklanjanje ADAR1 proteina u kasnoj fazi infekcije.

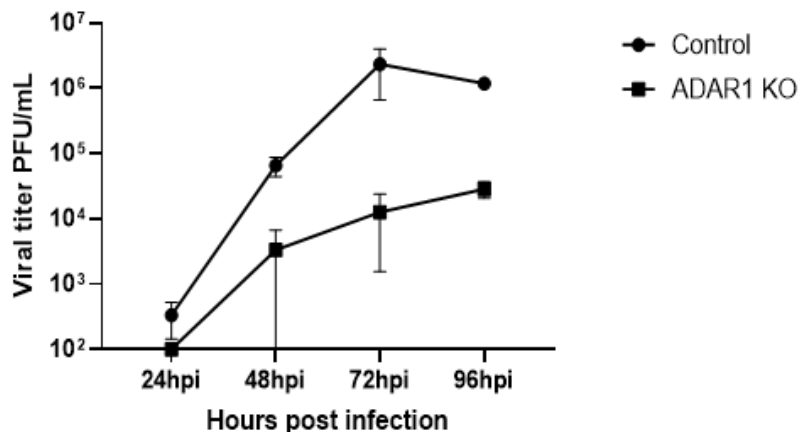
Nakon toga analizirali smo ekspresiju virusnih proteina kao indikatora virusne replikacije. Neposredno rani protein ICP4 detektiran je na molekularnoj veličini 175 kDa u inficiranim ADAR1 KO stanicama i kontrolnoj staničnoj liniji. Međutim uočili smo da je ekspresija proteina ICP4 daleko slabija u stanicama s nedostatkom ADAR1 u odnosu na kontrolne stanice i da se pojavljuje značajno kasnije. Tek u kasnim vremenima nakon infekcije (72 h.p.i.) ekspresija ICP4 u ADAR1 KO stanicama je usporedna s kontrolom. Ovi rezultati ukazuju da je replikacija HSV-1 otežana, odnosno usporena, u nedostatku ADAR1.

Analiza ekspresije protein gC, protein kasne faze infekcije, veličine 95 kDa potvrdila je dobivene rezultate s ICP4. Očekivano, signal gC proteina detektiran je samo u kasnim satima infekcije (48 i 72 hpi) u KO i *ctrl* stanicama, međutim znatno slabije kod KO (Slika 9).

Usporedno s WB analizom provedena je i titracija virusa u supernatantu inficiranih stanica tijekom 24, 48 i 72hpi. Iz grafikona (Slika 10) možemo odmah primijetiti da ADAR1 pospješuje virusnu replikaciju tj. broj PFU je veći u odnosu na KO staničnu liniju. Isto tako, statistički značajna razlika između ctrl i KO ADAR1 uzoraka, najizraženija je tijekom 48 i 72hpi. U 72hpi, virus je na vrhuncu infekcije te se nakon toga broj PFU smanjuje.



Slika 9. ADAR1 pozitivno utječe na virusnu replikaciju HSV-1 u HEK293A stanicama. Stanice su HEK293A stanice koje ne sadrže ADAR1 (ADAR1 KO) i kontrolne stanice inficirane su s HSV-1 pri niskom MOI koji iznosi 0.01. Uzorci za WB skupljeni su 1., 24., 48. i 72. hpi. Za WB analizu korišteno je primarno zečje anti-ADAR1-p110 protutijelo te mišje anti-ICP4 protutijelo i anti-gC protutijelo. Za kontrolu uzoraka korišteno je primarno mišje anti-actin protutijelo beta actin. Navedene su molekularne veličine proteina i njihova primarna protutijela.



Slika 10. ADAR 1 omogućuje efikasnu replikaciju HSV-1. HEK293A stanice koje ne sadrže ADAR1 (ADAR1 KO) i kontrolne stanice inficirane su s HSV-1 pri niskom MOI koji iznosi 0.01. Prikupljeni su supernatanti inficiranih stanica koji su korišteni za određivanje virusnog titra u Vero stanicama. Na x osi prikazani su sati nakon infekcije, a na y osi virusni titar koji se izražava kao PFU/mL. Statistički značajna razlika između staničnih linija prikazana je na 48 i 72 hpi.

4.2. Utjecaj ISRIB molekule na virusnu replikaciju u odsustvu ADAR1 proteina

Istraživanja u Laboratoriju za molekularnu virologiju su pokazala da u stanicama s nedostatkom ADAR1 dolazi do prekomjerne aktivacije protein kinaze R (PKR) što dovodi do fosforilacije translacijskog faktora eIF2 α te zaustavljanja sinteze proteina (ljubaznošću dr. Mie Cesarec). Glavna hipoteza ovog rada je da PKR-posredovana inhibicija translacije dovodi do slabije replikacije HSV-1. Kako bi smo testirali ovu hipotezu upotrijebili smo ISRIB, inhibitornu molekulu ISR, te ispitali utjecaj i ove molekule tijekom HSV-1 infekcije u kontekstu nedostatka proteina ADAR1. Prethodna istraživanja pokazala su da ISRIB vezujući se na eIF2 β onemogućuje

interakciju s eIF2 α koja bi dovela do inhibicije translacije te time može imati i značajan utjecaj na imunski odgovor stanice. Glavno pitanje koje se postavlja je hoće li ISRIB komplementirati nedostatak ADAR1 proteina i onemogućiti translacijsku blokadu te omogućiti efikasnu virusnu replikaciju.

Kako bi saznali odvija li se virusna replikacija uspješno u ISRIB tretiranim KO ADAR1 stanicama, provedena je WB analiza gdje smo ispitivali razinu ekspresije virusnih proteina ICP4, ADAR1, gC te proteina domaćina PKR, p-PKR i p-eIF2 α . U svakoj staničnoj liniji, analizirane su 3 vrste uzorka: ISRIB i DMSO (kao dodatna kontrola) tretirani, te netretirani uzorci (NT). HEK293A stanice, inficirane su pri MOI koji je iznosio 1 te su uzorci analizirani 24 sata nakon infekcije.

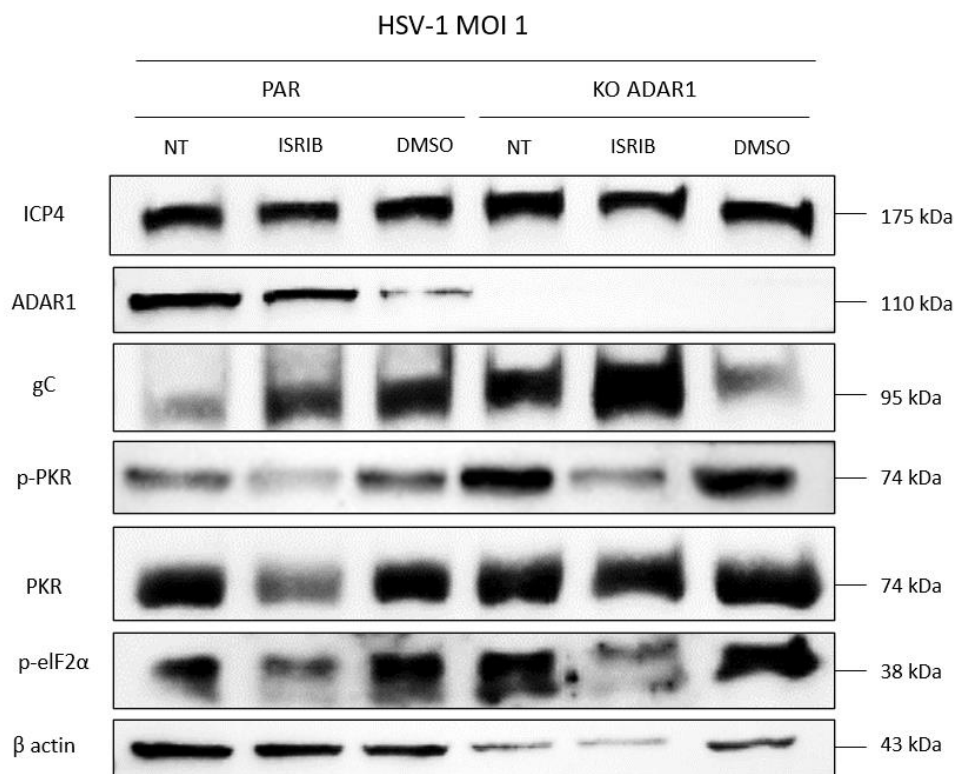
Kao što smo očekivali, signal ADAR1 proteina zabilježen je isključivo u PAR staničnoj liniji. Važno je napomenuti, tijekom ispitivanja ekspresije proteina koristili smo anti-ADAR1 zečje protututijelo koje je detektiralo molekularnu veličinu proteina na 110 kDa (Slika 11); dok ADAR p150 nije analiziran.

Iduće smo ispitivali uspješnost virusne infekcije analizirajući proteine rane i kasne infekcije u HSV-1 inficiranim KO ADAR1 i PAR staničnim linijama. Između pojedinačnih uzoraka nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji proteina te je molekularna veličina proteina ICP4 detektirana na 175 kDa. S druge strane, gC protein kasne infekcije, također je zabilježen u svim uzorcima molekularne veličine 95 kDa. U odnosu na ICP4, intenzitet zabilježenog signala gC proteina se razlikuje među uzorcima. U NT i DMSO uzorcima, vidljivo je slabija ekspresija proteina, u odnosu na ISRIB tretirane uzorke gdje je signal najjače izražen (Slika 11).

Sljedeći proteini čija je ekspresija analizirana bili su p-PKR i p-eIF2 α . p-PKR je protein koji je odgovoran za fosforilaciju faktora eIF2 α pri čemu dolazi do zaustavljanja sinteze virusne mRNA. Za detekciju proteina, korišteno je zečje anti-pPKR protututijelo. Na WB zabilježena je ekspresija proteina na molekularnoj veličini od 74 kDa. U PAR uzorcima vidljivo je da

je ekspresija ovog proteina smanjena u odnosu na KO ADAR1 uzorke. Međutim, tretiranjem stanica s ISRIB molekulom dolazi do promjene u jačini signala p-PKR. U oba uzorka vidimo da ISRIB uspješno utišava ekspresiju p-PKR u odnosu na ostale uzorke i samim time utječe na virusnu replikaciju (Slika 11).

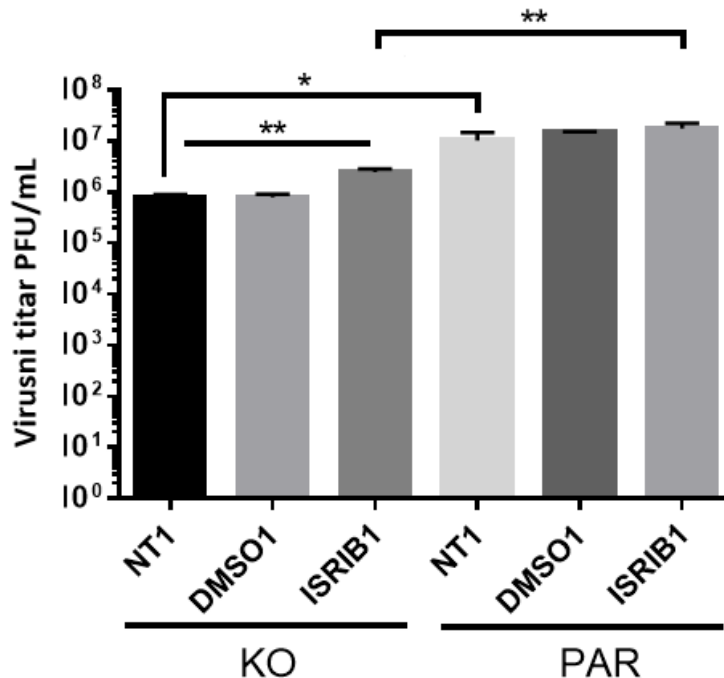
Nakon ekspresije p-PKR, detektiran je i protein p-eIF2 α te je molekularna veličina zabilježena na 38 kDa (Slika 11). Očekivano ekspresija p-eIF2 α pojačana je u NT i DMSO uzorcima, dok je u ISRIB tretiranim uzorcima zabilježena smanjena ekspresija ovog proteina. Zaključno, ovi rezultati pokazuju da je dodatak inhibitora ISRIB omogućio bolju replikaciju HSV-1 u ADAR1 KO stanicama, što sugerira da PKR-posredovana inhibicija translacije je mehanizam supresije HSV-1, a ne neki drugi mogući mehanizmi.



Slika 11. Inhibitorna molekula ISRIB djeluje provirusno tijekom HSV-1 infekcije u ADAR1 KO stanicama. Za WB analizu korištene su HEK293A stanice, ADAR1 KO i PAR. Stanice su inficirane HSV-1 pri visokom MOI koji iznosi 1. Uzorci za WB skupljeni 24 hpi. Za WB analizu korištena su zečja primarna anti-ADAR1, anti-p-PKR, anti-PKR i anti-p-eIF2 α protutijela te mišje anti-ICP4 i anti-gC protutijelo. Za kontrolu uzoraka korišteno je primarno mišje anti-actin protutijelo. Navedene su molekularne veličine proteina i njihova primarna protutijela.

Rezultati ovog eksperimenta dodatno su potvrđeni virusnom titracijom. Virusni titar jasno prikazuje razliku između KO ADAR1 i kontrolne stanične linije. Broj PFU je veći u kontrolnim uzorcima koji su NT i tretirani s DMSO u usporedbi s ADAR1 KO linijom. Isto tako, prikazana je statistički značajna razlika između netretiranih i ISRIB tretiranih uzoraka gdje je broj PFU najveći (Slika 12). Napomena, pokusi su provedeni tri puta i rezultati

su reproducibilni, a Slike 11 i 12 prikazuju reprezentativne rezultate jednog od pokusa.



Slika 12. HSV-1 se efikasno replicira u ADAR1 KO stanicama nakon tretmana s ISRIB. Uspoređivana kontrolna i KO ADAR1 stanična linija tretirane s ISRIB molekulom, DMSO te netretirani uzorci. Razlike između uzoraka prikazane su t-testom. Zvezdice (*) i (**) označavaju statistički značajnu razliku $p \leq 0.05$ i $p \leq 0.01$.

4.3. Detekcija proteina ICP34.5.u HEK293T stanicama

Naši prethodni rezultati pokazali su da aktivacije PKR dovodi do inhibicije translacije te time onemogućuje efikasnu replikaciju HSV-1 u stanicama s nedostatkom ADAR1. Međutim, valjda naglasiti da HSV-1 kodira nekoliko inhibitora PKR aktivacijskog puta, uključujući ICP34.5 i US11. Naša hipoteza je da u nedostatku ADAR1 dolazi do prekomjerne aktivacije PKR koju HSV-1 nije u stanju inhibirati s kasno eksprimiranim

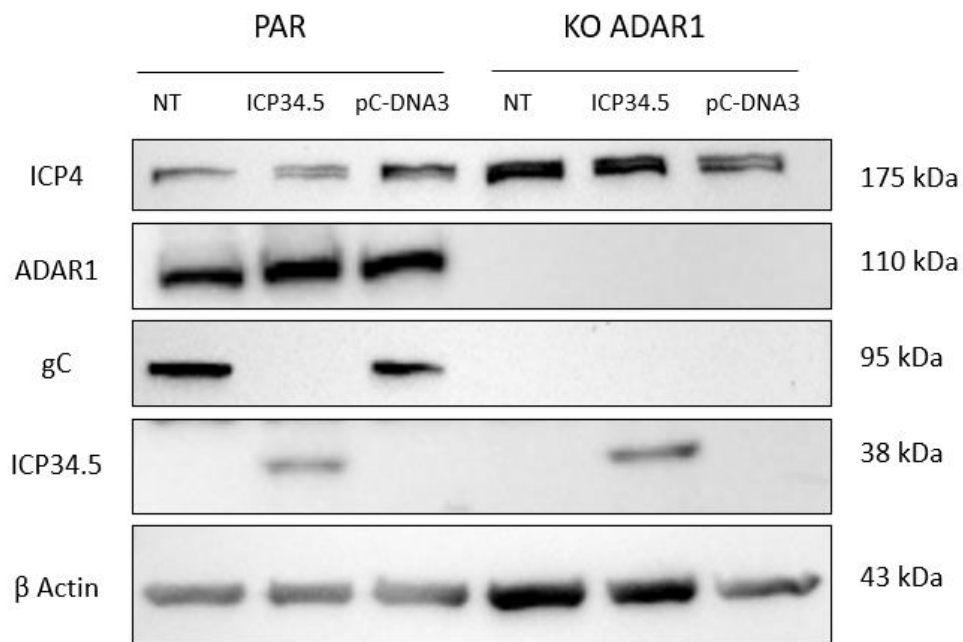
proteinom ICP34.5. Kako bi smo ispitali ovu hipotezu, proveli smo pokuse u kojima bi osigurali određenu razinu ICP34.5 proteina u ADAR1 KO stanicama prije same infekcije što bi trebalo komplementirati nedostatak ADAR1. Ukratko, ICP34.5 je protein HSV-1 kasne infekcije koji utječe na antivirusni odgovor domaćina. Kako bi se utvrdila prisutnost ICP34.5 i učinak na virusnu replikaciju, provedena je WB analiza. Korištene su KO ADAR1 i PAR kontrolne HEK293T stanične linije. Prethodno su stanice transficirane s plazmidima pcDNA3-ICP34.5-FLAG (nosi gen za ICP34.5 fuzioniran s FLAG biljekom), pC-DNA3 te pEGFPN1GFP. GFP plazmid transficiran je zajedno s ICP34.5 i pCDNA3 plazmidima kako bi se mogla pratiti uspješnost transfekcije pomoću fluorescencije i razine GFP (rezultati nisu prikazani za GFP). 24 sata nakon transfekcije stanice su inficirane s HSV-1.

Prisutnost ADAR1 proteina zabilježena je samo u PAR staničnoj liniji koristeći zečje anti-ADAR1 protutijelo, na molekularnoj veličini od 110 kDa. Očekivano, u PAR i KO ADAR1 staničnoj liniji koji su transficirani s ICP34.5 plazmidom, detektiran je ICP34.5 protein na veličini od približno 38 kDa (Slika 13). Detekcijom proteina u ICP34.5 transficiranim uzorcima, dodatno smo potvrdili uspješnost transfekcije.

Kao i u prethodnim rezultatima, tako smo i ovdje analizirali ekspresiju proteina rane (ICP4) i kasne infekcije (gC). Iznenadujuće, zabilježena je pojačana aktivnost ICP4 proteina u KO ADAR1 staničnoj liniji u odnosu na PAR staničnu liniju (Slika 13). Osim toga, u uzorcima koji su tretirani s ICP34.5 također nismo detektirali pojačani signal u odnosu na ostale uzorke. U WB analizi očekivali smo pojačanu ekspresiju proteina ICP4 u uzorcima koje sadrže ADAR1 protein i koji su tretirani s ICP34.5 plazmidom, obzirom da prema prethodnim istraživanjima, posjeduju provirusnu ulogu te bi virusna replikacija trebala biti jačeg intenziteta.

Sljedeće smo analizirali ekspresiju proteina gC. Signal proteina zabilježen je samo u PAR staničnoj liniji u NT i pC-DNA3 uzorcima, na molekularnoj veličini 95 kDa (Slika 13). Ono što je poprilično neobično u

rezultatima WB analize je to što nije detektiran u ICP34.5 tretiranim uzorcima gdje bi se virusna replikacija trebala normalno odvijati. Zaključno, ovi rezultati pokazuju da ektopična ekspresija ICP34.5 bi doista mogla komplementirati nedostatak ADAR1, međutim, rezultati tek trebaju biti potvrđeni s dodatnim pokusima.



Slika 13. Ekspresija ICP34.5 proteina u HEK293T stanicama. Za WB analizu korištene su HEK293T stanice, ADAR1 KO i PAR. Stanice su inficirane HSV-1 pri MOI 1. Uzorci za WB skupljeni 24 hpi. Za WB analizu korišteno je primarno zečje anti-ADAR1 i anti-FLAG protutijelo, te mišje anti-ICP4 i anti-gC protutijelo. Za kontrolu uzoraka korišteno je primarno mišje anti-actin protutijelo. Navedene su molekularne veličine proteina i njihova primarna protutijela.

5. Rasprava

Virusi su razvili različite mehanizme kako bi utjecali na imunوسي odgovor domaćina. Ovisno o interakciji virusnih proteina i proteina domaćina, HSV-1 infekcija može imati različite ishode. Jedan od virusnih proteina na koja su usmjerena brojna istraživanja je faktor neurovirulencije ICP34.5. Ovaj protein pokazao se uspješnim u suzbijanju antivirusnog odgovora i poboljšavanju virusne replikacije. Osim virusnih, postoje i drugi proteini koji mogu promijeniti tijek virusne infekcije. Primjer takvih proteina su ADARs enzimi koji su odgovorni za editiranje dsRNA pri čemu mogu djelovati provirusno, antivirusno ili bez učinka. S druge strane, postoje vanjski čimbenici i molekule pomoću kojih se može utjecati na učinkovitost virusne replikacije. Nedavno je otkrivena molekula ISRIB koja se pokazala uspješnim inhibitorom integriranog odgovora na stres domaćina.

S obzirom na prethodna istraživanja i ispitivanja učinka ADAR1 proteina na HSV-1 infekciju, prvi cilj ovog eksperimenta bio je analizirati učinak ADAR1 proteina na virusnu replikaciju. Koristeći kontrolne stanice te stanice u kojima nije prisutan ADAR1 („knock-out“), ispitivala se ekspresija proteina rane i kasne HSV-1 infekcije. Očekivano, gC kao protein kasne infekcije, detektiran je u kasnim satima HSV-1 infekcije u kontrolnim stanicama u odnosu na ADAR1 KO staničnu liniju. Međutim, signal ICP4 proteina rane infekcije, zabilježen je također isključivo u kasnim satima infekcije. Mogući razlog zbog kojeg rani protein ICP4 nije vidljiv u ranim satima infekcije, je niski MOI koji je iznosio 0.01. U tom slučaju se sporije proizvode novi virusi jer ima manje virusnih čestica nego stanica te se ne može proizvesti dovoljna količina ranih proteina na početku HSV-1 infekcije. Ovim rezultatom potvrdili smo da ADAR1 protein ima provirusnu ulogu u HSV-1 infekciji.

Sljedeći korak bio je ispitati utjecaj inhibitorne molekule ISRIB na virusnu infekciju. Prethodna saznanja govore o tome da ISRIB utječe na

fosforilaciju eIF2 α tijekom izlaganja staničnom stresu i na taj način sprječava ISR odgovor. Ono što je bila svrha ovog ispitivanja je ispitati hoće li ISRIB uspjeti nadomjestiti provirusnu ulogu ADAR1 proteina u KO staničnoj liniji i tako omogućiti nesmetanu virusnu replikaciju. WB analizom pokazala se prisutnost virusnih proteina rane infekcije i kasne infekcije 24hpi. U odnosu na prethodne rezultate, ICP4 protein je zabilježen u ranijem stadiju infekcije zahvaljujući MOI koji je iznosio 1 te se u tom slučaju veći broj stanica inficirao i proizvela se dovoljna količina ranih proteina. Samim time, rezultati su pokazali da inhibicija aktivirane blokade translacije ima provirusni učinak te da smanjuje fosforilaciju eIF2 α u KO ADAR1 i kontrolnoj staničnoj liniji. S obzirom da su prethodna istraživanja pokazivala djelovanje ISRIB-a isključivo na fosforilaciju eIF2 α , ono što je bilo iznenađujuće je smanjena ekspresija fosforilane PKR kinaze u ISRIB tretiranim uzorcima. Ovime se postavlja pitanje mehanizma djelovanja ISRIB-a tijekom HSV-1 infekcije koje bi se u budućnosti trebalo dalje istraživati.

S druge strane, analizirali smo mogućnost da ektopična ekspresija proteina koji inhibira PKR-posredovanu aktivaciju blokade translacije omogući efikasnu replikaciju HSV-1 u nedostatku ADAR1. Očekivano, WB analizom smo pokazali ekspresiju proteina s FLAG biljekom na aproksimalno 38 kDa te potvrdili uspješnu transfekciju stanica s ICP34.5 plazmidom. Osim tretiranja stanica s ICP34.5 plazmidom, u iste uzorke dodali smo i GFP plazmid kako bi mogli i vizualno zabilježiti učinkovitost transfekcije (rezultati nisu prikazani). Međutim, analiza učinka na infekciju je dala nekoliko rezultata koje u ovom trenutku ne možemo objasniti. Neočekivano, ekspresija ICP34.5 u kontrolnim stanicama dovela je do inhibicije virusne replikacije (Slika 13), sudeći prema ekspresiji virusnog proteina gC. Moguće je da je ekspresija dva proteina, ICP34.5 i GFP, dovela do aktivacije obrambenih mehanizama stanice, poput IFI16 (engl. *Gamma-interferon-inducible protein 16*) koji prepoznaje stranu DNA ili aktivacije ER stresa, te time onemogućila replikaciju virusa. S druge strane, u ADAR KO stanicama

ekspresija ICP34.5 dovela je do određene pojačane razine ekspresija ICP4 u odnosu na netransficirane stanice ili stanice transficirane s plazmidom pCDNA, što bi sugeriralo komplementaciju ADAR1. Međutim, postignuta komplementacija je slaba jer nije bilo moguće detektirati pojačanu ekspresiju kasnog proteina gC. Ovi rezultati mogu se tumačiti relativno slabom efikasnošću transfekcije stanica (procijenjeno do maksimalno 20%). Ovaj problem je moguće riješiti na različite načine, uključujući izdvajanje transficiranih stanica tako da selektiramo stanice pomoću „cell-sorter“ ARIA, međutim infekciju na selektiranim stanicama nije bilo moguće provesti. Zaključno, iako naši pokusi zahtijevaju dodatnu optimizaciju i ponavljanja, dobiven je važan doprinos i potvrda uloge PRK i ADAR1 u regulaciji HSV-1 replikacije.

6. Zaključak

Istraživački rad temeljio se na analizi ekspresije virusnih proteina te proteina signalizacijskog puta PKR u odsustvu ADAR1 proteina. Osim toga, ispitivao se i utjecaj naknadno dodanih čimbenika poput inhibitorne molekule ISRIB te faktora neurovirulencije ICP34.5, na virusnu replikaciju HSV-1.

U ovom radu, potvrdili smo provirusnu ulogu ADAR1 proteina tijekom HSV-1 virusne infekcije zahvaljujući KO ADAR1 modelu. WB analizom prikazali smo ekspresiju virusnih proteina rane i kasne infekcije i samim time uspješnost virusne replikacije u prisustvu ADAR1 proteina. Provirusna uloga ADAR1 kod replikacije herpesvirusa mogla bi djelovati kroz različite molekularne mehanizme obzirom da ADAR1 stupa u interakciju s brojnim proteinima te je uključen u brojne procese. dsRNA-vezujući senzori poput PKR, MDA5, RIG-I, Z DNA vezujući protein 1 (*engl. Z-DNA-binding protein 1, ZBP1*) mogli bi biti efektori ove inhibicije. Prijašnja istraživanja Laboratorija za molekularnu virologiju pokazala su da je aktivacija PKR glavni inhibitor, što smo potvrdili i ovim radom. Koristeći inhibitornu molekulu ISRIB pokazali smo da je aktivacija PKR molekularni mehanizam koji onemogućuje efikasnu replikaciju HSV-1 u nedostatku ADAR1 i da dodatak inhibitora komplimentira nedostatak. Ektopična ekspresija virusnog ICP34.5, inhibitora PKR signalnog puta, dovela je do pojačane ekspresije neposredno ranog proteina ICP4 u ADAR1 KO stanicama, međutim i do inhibicije virusne replikacije u kontrolnim stanicama. Za točnu disekciju ovog signalnog puta potrebno je provesti dodatna istraživanja.

7. Literatura

1. Whitley RJ. Herpesviruses. 1996.
2. Madavaraju K, Koganti R, Volety I, Yadavalli T, Shukla D. Herpes Simplex Virus Cell Entry Mechanisms: An Update. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Jan 18;10.
3. Engel EA, Song R, Koyuncu OO, Enquist LW. Investigating the biology of alpha herpesviruses with MS-based proteomics. *Proteomics*. 2015 Jun;15(12):1943–56.
4. Saleh D, Yarrarapu SNS, Sharma S. Herpes Simplex Type 1. 2023.
5. Engel EA, Song R, Koyuncu OO, Enquist LW. Investigating the biology of alpha herpesviruses with MS-based proteomics. *Proteomics*. 2015 Jun;15(12):1943–56.
6. Smith S, Reuven N, Mohni KN, Schumacher AJ, Weller SK. Structure of the Herpes Simplex Virus 1 Genome: Manipulation of Nicks and Gaps Can Abrogate Infectivity and Alter the Cellular DNA Damage Response. *J Virol*. 2014 Sep;88(17):10146–56.
7. Connolly SA, Jardetzky TS, Longnecker R. The structural basis of herpesvirus entry. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Feb 21;19(2):110–21.
8. McElwee M, Vijayakrishnan S, Rixon F, Bhella D. Structure of the herpes simplex virus portal-vertex. *PLoS Biol*. 2018 Jun 20;16(6):e2006191.
9. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol*. 2007 May;17(3):205–15.
10. Rajčáni J, Andrea V, Ingeborg R. Peculiarities of Herpes Simplex Virus (HSV) Transcription: An overview. *Virus Genes*. 2004 Apr;28(3):293–310.

11. Gruffat H, Marchione R, Manet E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Front Microbiol.* 2016 Jun 6;7.
12. Pesola JM, Zhu J, Knipe DM, Coen DM. Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early and Early Gene Expression during Reactivation from Latency under Conditions That Prevent Infectious Virus Production. *J Virol.* 2005 Dec 15;79(23):14516–25.
13. Heath JR, Dembowski JA. Fashionably late: Temporal regulation of HSV-1 late gene transcription. *PLoS Pathog.* 2022 Jun 16;18(6):e1010536.
14. Li Y, Zhang C, Chen X, Yu J, Wang Y, Yang Y, et al. ICP34.5 Protein of Herpes Simplex Virus Facilitates the Initiation of Protein Translation by Bridging Eukaryotic Initiation Factor 2 α (eIF2 α) and Protein Phosphatase 1. *Journal of Biological Chemistry.* 2011 Jul;286(28):24785–92.
15. Ripa I, Andreu S, López-Guerrero JA, Bello-Morales R. Interplay between Autophagy and Herpes Simplex Virus Type 1: ICP34.5, One of the Main Actors. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 7;23(21):13643.
16. Manivanh R, Mehrbach J, Charron AJ, Grassetti A, Cerón S, Taylor SA, et al. Herpes Simplex Virus 1 ICP34.5 Alters Mitochondrial Dynamics in Neurons. *J Virol.* 2020 Jul;94(14).
17. Manivanh R, Mehrbach J, Knipe DM, Leib DA. Role of Herpes Simplex Virus 1 γ 34.5 in the Regulation of IRF3 Signaling. *J Virol.* 2017 Dec;91(23).
18. Mossman KL, Smiley JR. Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol.* 2002 Feb;76(4):1995–8.
19. Leib DA, Alexander DE, Cox D, Yin J, Ferguson TA. Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 Modulates Herpes Simplex Virus Type 1

- Pathogenesis through Control of CD4⁺ T-Cell Responses. *J Virol*. 2009 Dec;83(23):12164–71.
20. Wilcox DR, Longnecker R. The Herpes Simplex Virus Neurovirulence Factor γ 34.5: Revealing Virus–Host Interactions. *PLoS Pathog*. 2016 Mar 10;12(3):e1005449.
 21. Mellman I. Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunol Res*. 2013 Sep 1;1(3):145–9.
 22. Jin H, Ma Y, Prabhakar BS, Feng Z, Valyi-Nagy T, Yan Z, et al. The γ 34.5 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Is Required To Interfere with Dendritic Cell Maturation during Productive Infection. *J Virol*. 2009 May 15;83(10):4984–94.
 23. Piontkivska H, Wales-McGrath B, Miyamoto M, Wayne ML. ADAR Editing in Viruses: An Evolutionary Force to Reckon with. *Genome Biol Evol*. 2021 Nov 5;13(11).
 24. Samuel CE. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral. *Virology*. 2011 Mar;411(2):180–93.
 25. Pfaller CK, George CX, Samuel CE. Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs) and Viral Infections. *Annu Rev Virol*. 2021 Sep 29;8(1):239–64.
 26. Raghava Kurup R, Oakes EK, Manning AC, Mukherjee P, Vadlamani P, Hundley HA. RNA binding by ADAR3 inhibits adenosine-to-inosine editing and promotes expression of immune response protein MAVS. *Journal of Biological Chemistry*. 2022 Sep;298(9):102267.
 27. Wang Y, Chung D hee, Monteleone LR, Li J, Chiang Y, Toney MD, et al. RNA binding candidates for human ADAR3 from substrates of a gain of function mutant expressed in neuronal cells. *Nucleic Acids Res*. 2019 Nov 18;47(20):10801–14.

28. Song B, Shiromoto Y, Minakuchi M, Nishikura K. The role of RNA editing enzyme ADAR1 in human disease. *WIREs RNA*. 2022 Jan 8;13(1).
29. Savva YA, Rieder LE, Reenan RA. The ADAR protein family. *Genome Biol*. 2012;13(12):252.
30. Chew T, Taylor K, Mossman K. Innate and Adaptive Immune Responses to Herpes Simplex Virus. *Viruses*. 2009 Nov 18;1(3):979–1002.
31. Lamers MM, van den Hoogen BG, Haagmans BL. ADAR1: “Editor-in-Chief” of Cytoplasmic Innate Immunity. *Front Immunol*. 2019 Jul 25;10.
32. Song B, Shiromoto Y, Minakuchi M, Nishikura K. The role of RNA editing enzyme ADAR1 in human disease. *WIREs RNA*. 2022 Jan 8;13(1).
33. Hajji K, Sedmík J, Cherian A, Amoruso D, Keegan LP, O’Connell MA. ADAR2 enzymes: efficient site-specific RNA editors with gene therapy aspirations. *RNA*. 2022 Oct;28(10):1281–97.
34. Quin J, Sedmík J, Vukić D, Khan A, Keegan LP, O’Connell MA. ADAR RNA Modifications, the Epitranscriptome and Innate Immunity. *Trends Biochem Sci*. 2021 Sep;46(9):758–71.
35. Barraud P, Allain FHT. ADAR Proteins: Double-stranded RNA and Z-DNA Binding Domains. In 2011. p. 35–60.
36. Rabouw HH, Langereis MA, Anand AA, Visser LJ, de Groot RJ, Walter P, et al. Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019 Feb 5;116(6):2097–102.
37. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep*. 2016 Oct;17(10):1374–95.

38. Burgess HM, Mohr I. Defining the Role of Stress Granules in Innate Immune Suppression by the Herpes Simplex Virus 1 Endoribonuclease VHS. *J Virol.* 2018 Aug;92(15).
39. Campos-Melo D, Hawley ZCE, Droppelmann CA, Strong MJ. The Integral Role of RNA in Stress Granule Formation and Function. *Front Cell Dev Biol.* 2021 May 20;9.
40. Sidrauski C, McGeachy AM, Ingolia NT, Walter P. The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2 α phosphorylation on translation and stress granule assembly. *Elife.* 2015 Feb 26;4.
41. Wong YL, LeBon L, Edalji R, Lim H Ben, Sun C, Sidrauski C. The small molecule ISRIB rescues the stability and activity of Vanishing White Matter Disease eIF2B mutant complexes. *Elife.* 2018 Feb 28;7.
42. Anand AA, Walter P. Structural insights into ISRIB, a memory-enhancing inhibitor of the integrated stress response. *FEBS J.* 2020 Jan 7;287(2):239–45.
43. Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):14–21.
44. Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJT, Adams CM, et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell.* 2016 May;27(9):1536–51.

8. Životopis

Lidia Žilić

📍 Rasadnik 2, Novi Vinodolski 51250, Hrvatska

☎ +385 91 977 70 67

✉ lidia.zilic@student.uniri.hr, lidiazilic88@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 03/05/1999

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Rujan 2021-trenutno

Diplomski studij Biotehnologija u medicini, Odjel za biotehnologiju

Radimile Matejčić 2, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

Travanj 2022-Siječanj 2023

TOMO Global Health Community

Online program s ciljem održivog poticanja globalnog zdravlja iz cijelog svijeta

Rujan 2018-Rujan
2021

Prvostupnica biotehnologije I istraživanja lijekova, Odjel za biotehnologiju
(BSc.biotech.et pharm.inv. cum laude)

Radimile Matejčić 2, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

-Kemija, Biologija, Fizika, Kemoinformatika
-praktični rad u laboratoriju

Rujan 2014-Rujan 2018

Srednja Škola dr. Antuna Barca, smjer gimnazija, Crikvenica, Hrvatska

Rujan 2006-Rujan 2014

Osnovna Škola Ivana Mažuranića, Novi Vinodolski, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

Lipanj 2022-Srpanj 2022

Studentska stručna praksa

Zavod za javno zdravstvo: odjel za mikrobiologiju okoliša i vode
-Krešimirova 52a, Rijeka (Hrvatska)
-tehnika membranske filtracije
-analiza uzoraka i detekcija patogena

Ožujak 2023-Lipanj 2023

Izrada eksperimentalnog diplomskog rada

Laboratorij za molekularnu virologiju, Odjel za biotehnologiju i istraživanje lijekova, Rijeka (Hrvatska)

Mentor: izvr.prof.dr.sc. Igor Jurak

DODATNO RADNO
ISKUSTVO
Lipanj 2016-Rujan 2023

Sezonski poslovi

Dm drogerie markt, Hrv. Branitelja 3, Novi Vinodolski (Hrvatska)

Novi fortis d.o.o., Krasa 43, Novi Vinodolski (Hrvatska)

POPULARIZACIJA ZNANOSTI

Projekti

Putujući znanstvenici, Otvoreni dani odjela za biotehnologiju

Konferencije

TOMO Global Health, Budućnost i perspektiva (pasivni sudionik)

Članstvo

Udruga Studenata Biotehnologije u Rijeci - UNIRI, TOMO Global Health Community

NAGRADE

Listopad-Rujan
2014-2022

Stipendija

Stipendija grada Novog Vinodolskog za izvrsnost

OSOBNE VJEŠTINE

Jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C2	C1	C1	C1	C1
Talijanski	A2	A1	A1	A1	A1
Njemački	A2	A2	A2	A1	A2

Stupnjevi: A1/2: Početnik- B1/2: Samostalni korisnik- C1/2: Iskusni korisnik
Zajednički referentni europski okvir za jezike

Organizacijske/rukovoditeljske vještine	Odlične organizacijske vještine
Poslovne vještine	Sposobna raditi u timu Otvorena učenju novih vještina
Digitalne vještine	Odlično poznavanje Microsoft Office programa Osnovno znanje rada u programima Avogadro, Marvin Sketch, R Studio, Clone Manager, VMD. Chimera, Lig Plus, Flare i Spark te programu Statistica
Vozačka dozvola	B
DODATNE INFORMACIJE	<hr/>
Ostali projekti	Volontiranje na projektima "Kuglice dobrih želja" te "Studenti-mentori"