

ADAR1 onemogućuje aktivaciju protein kinaze R kod replikacije herpes simpleks virusa 1

Čunko, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:631053>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**

Repository / Repozitorij:



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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiolski sveučilišni studij
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Marina Čunko

**ADAR1 onemogućuje aktivaciju protein kinaze R kod
replikacije herpes simpleks virusa 1**

Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiolski sveučilišni studij
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Marina Čunko

**ADAR1 onemogućuje aktivaciju protein kinaze R kod
replikacije herpes simpleks virusa 1**

Završni rad

Rijeka, 2023.

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

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate study
Biotechnology and drug research

Marina Čunko

**ADAR1 prevents protein kinase R activation in herpes
simplex virus 1 infection**

Undergraduate thesis

Rijeka, 2023.

Mentor: Igor Jurak, Ph.D., Assoc. Prof.

Zahvale

Prije svega, želim se zahvaliti svom mentoru Igoru Juraku, na iznimnoj pomoći, podršci i vodstvu koje ste mi pružili tijekom procesa istraživanja i pisanja ovog rada. Iskreno sam zahvalna što ste mi dali priliku da budem jedan od studenata koje ste mentorirali i što ste me poticali da se uključim u projekte izvan ovog rada.

Također, želim izraziti svoju zahvalnost svim članovima Laboratorija za molekularnu virologiju koji su mi pomogli da se snađem u laboratoriju i izdvojili vrijeme kako bi me usmjeravali u ovom procesu. Hvala vam na strpljenju i razumijevanju koje ste imali. Puno sam naučila od vas.

Na kraju, od srca hvala mojoj obitelji i prijateljima na neizmjeranoj podršci koju su ste mi pružili tijekom cijelog preddiplomskog studija. Vaša ljubav, ohrabrenje i vjera u mene svakodnevno su me poticali da dajem najbolje od sebe. Hvala što ste bili uz mene i pomogli mi da ostvarim svoje ciljeve.

Rad je obranjen dana 21. 09. 2023. godine pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Željka Maglica
2. prof. dr. sc. Mladen Merćep
3. Izv. prof. dr. sc. Igor Jurak (mentor)

Rad sadrži 24 stranice, 3 slike, i 18 literaturnih navoda.

Sažetak

Adenozin deaminaza koja djeluje na RNA (ADAR, prema eng. *adenosine deaminase acting on RNA*) katalizira pretvorbu adenozina u inozin na dvolančanim RNA molekulama. Pokazalo se da ADAR1, član obitelji ADAR proteina, može ciljati i virusne RNA transkripte te utjecati na proces replikacije virusa. Ovisno o virusu, njegova uloga može biti provirusna ili antivirusna. Pro- i antivirusne funkcije ADAR1 enzima dobro su istražene za brojne RNA viruse, ali malo se zna o njihovoj ulozi u replikaciji DNA virusa. U našem istraživanju, koristili smo HEK293 stanice sa stabilnom delecijom ADAR1 gena (ADAR1 KO stanice) kako bi testirali učinak nedostatka ADAR1 u infekciji herpes simpleks virusom tip 1 (HSV-1), široko rasprostranjenom ljudskom DNA virusu. Otkrili smo da je replikacija HSV-1 otežana u stanicama s nedostatkom ADAR1 u usporedbi s kontrolnim stanicama. Dodatno, istražili smo potencijalne mehanizme kojima ADAR1 ostvaruje svoj provirusni efekt. Provjerili smo razine proteina uključenih u signalne puteve urođene imunosti, kao i njihove posttranslacijske modifikacije. Otkrili smo da smanjena replikacija HSV-1 u ADAR1 KO stanicama korelira s pojačanom aktivacijom signalnog puta PKR kinaze, ključne kinaze za aktivaciju urođenih protuvirusnih odgovora domaćina. Zajedno, naši rezultati sugeriraju da ADAR1 sprječava PKR-posredovan prekid translacije proteina te time ispoljava provirusni učinak na infekciju HSV-1.

Ključne riječi: adenozin deaminaza koja djeluje na RNA, herpes simpleks 1, urođena imunost, PKR

Abstract

Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) catalyzes the conversion of adenosine to inosine on double-stranded RNA molecules. It has been shown that ADAR1, a member of the ADAR protein family, can target viral RNA transcripts and affect the virus replication process. Depending on the virus, its role can be either proviral or antiviral. The pro- and antiviral functions of ADAR1 have been well studied for numerous RNA viruses, but little is known about their role in DNA virus replication. In our study, we utilized HEK293 cells with a stable deletion of the ADAR1 (ADAR1 KO) to test the effect of ADAR1 deficiency in herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection, a widespread human DNA virus. We found that HSV-1 replication is impaired in ADAR1-deficient cells compared to control cells. Additionally, we investigated the potential mechanisms through which ADAR1 exerts its proviral effect. We analyzed the levels of proteins involved in the innate immunity signaling pathways, as well as their post-translational modifications. We found that reduced HSV-1 replication in ADAR1 KO cells correlates with the enhanced activation of the PKR kinase signaling pathway, a key kinase for the activation of host innate antiviral responses. Taken together, our findings suggest that ADAR1 suppresses the PKR-mediated translational shutdown, thus having a proviral effect on HSV-1 infection.

Keywords: adenosine deaminase acting on RNA, herpes simplex 1, innate immunity, PKR

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Adenozin deaminaza koja djeluje na RNA.....	1
1.2 Urođeni imunosni odgovor	4
1.2.1 ADAR1 kao ključni regulator urođene imunosti	5
1.3 Herpes simpleks virus tip 1	8
2. Cilj rada	10
3. Materijali i metode	11
3.1 Stanice.....	11
3.2 Ekstrakcija proteina i western blot	11
4. Rezultati	14
4.1 Replikacija HSV-1 virusa smanjena je u stanicama s nedostatkom ADAR1	14
4.2 Provirusna uloga ADAR1 posredovana je supresijom fosforilacije PKR kinaze	17
4.3 Provirusni učinak ADAR1 na HSV-1 infekciju nije povezan s interferonskom signalizacijom i NF- κ B putem.....	18
4.4 ADAR1 smanjuje ekspresiju STING proteina tijekom HSV-1 infekcije	18
4.5 ADAR1 nema utječe na OAS1-RNaseL signalni put tijekom HSV-1 infekcije	19
5. Rasprava	20
6. Zaključak.....	22
7. Literatura.....	23

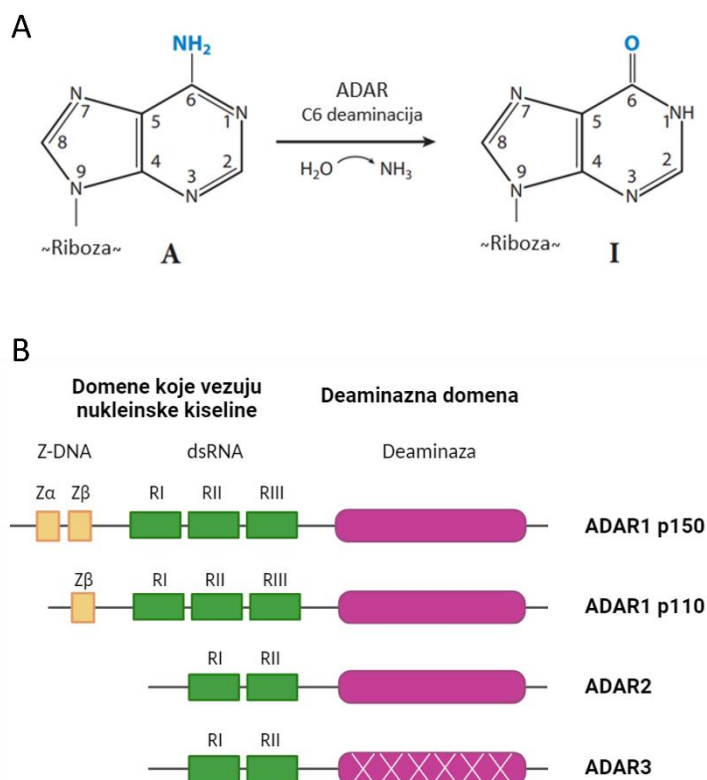
1. Uvod

1.1 Adenzin deaminaza koja djeluje na RNA

Adenzin deaminaza koja djeluje na RNA (ADAR, prema eng. *adenosine deaminase acting on RNA*) enzim je koji katalizira posttranskripcijsku pretvorbu adenozina u inozin na dvolančanim RNA molekulama (dsRNA, prema eng. *double-stranded RNA*) (Slika 1. A). Ovaj proces modifikacije RNA transkripata poznat je kao A-u-I uređivanje (eng. *A-to-I editing*) te je prvi puta zabilježen u antisens RNA istraživanjima na žabama iz obitelji *Xenopus*, prilikom kojih je utvrđeno da ekstrakti iz embrija vodozemaca imaju aktivnost koja odmotava dsRNA strukture (1). Kasnije je isto pokazano u stanicama sisavaca, a promjene u ponašanju dsRNA bile posljedica oslabljenog sparivanja baza uzrokovanog hidrolitičkom deaminacijom adenozina u inozin (2). Obzirom da su pogrešno sparene inozin-uracil baze (I-U) manje stabilne od adenozin-uracil (A-U) parova, *A-to-I editing* znatno je utjecao na sekundarnu strukturu i stabilnost dsRNA. *A-to-I editing* najčešći je oblik posttranskripcijskog RNA uređivanja u sisavaca, pri čemu ADAR-i mogu deaminirati točno određene adenozine unutar transkripata (selektivno uređivanje) ili nasumično uređivati više adenozina od jednom (nespecifično hiper-editiranje) (3). Visoko selektivno uređivanje događa se unutar kodirajućih RNA, što utječe na točnost translacije budući da se inozin prepoznaje kao gvanozin i sparuje s citozinom. Ova modifikacija rezultira supstitucijom aminokiselina i promijenjenom funkcijom sintetiziranih proteina. Hipereditiranje najčešće je zabilježeno u nekodirajućim dijelovima genoma, poput ponavljajućih Alu sekvenci, koji tvore gotovo savršene RNA duplekse.

ADAR enzimi rasprostranjeni su diljem životinjskog carstva te su visoko očuvani među različitim vrstama (3). U ljudi, tri ADAR gena (ADAR1, ADAR2 i ADAR3) kodiraju četiri različita ADAR proteina (Slika 1. B). ADAR1, koji je glavni fokus ovog istraživanja, zaslužan je za većinu *A-to-I editing* procesa te se pojavljuje u dva izoformna oblika; konstitutivno eksprimiranog ADAR1

p110 i ADAR1 p150 čija je ekspresija inducirana interferonima. P110 izoform gotovo je isključivo lokaliziran u jezgri, dok se p150 u velikoj mjeri nalazi u citoplazmi. Oba sadrže domenu katalitičke deaminaze u svojim C-terminalnim regijama i tri kopije dsRNA-vezujućih domena (RI, RII i RIII). Glavna strukturna razlika između dva izoforma je u Z-DNA vezujućim domenama; ADAR1 p150 ima dvije ponovljene kopije, Z α i Z β u N-terminalnoj regiji, dok ADAR1 p110 ima samo Z β . ADAR2 primarno je odgovoran za visoko selektivno A-u-I uređivanje transkripata u stanicama neurona. Sadrži dvije kopije RNA-vezujućih domena u N-terminalnoj regiji i domenu katalitičke deaminaze u C-terminalnoj regiji, ali nema Z-DNA vezujuću domenu. Za razliku od ADAR1 i ADAR2 koje nalazimo u gotovo svim tkivima, ekspresija ADAR3 ograničena je na živčani sustav. ADAR3 strukturno je jednak ADAR2 proteinu, ali ne pokazuje katalitičku deaminaznu aktivnost.



Slika 1. ADAR-posredovano RNA uređivanje (A) A-to-I editing. ADAR-i kataliziraju hidrolitičku C6 deaminaciju na adenzinu (A) pri čemu nastaje inozin (I). **(B)** Obje izoforme ADAR1 (p150 i p110) i ADAR2 sadrže aktivne

deaminazne domene (ljubičasto), dok ADAR3 ne posjeduje katalitičku aktivnost (prekrižene crte). Ponovljene dsRNA vezujuće domene (zeleno) označene su RI, RII i RIII. ADAR1 p150 posjeduje dvije kopije Z-DNA vezujućih domena (žuto, Z α i Z β), dok ADAR1 p110 posjeduje samo Z β . Slika je napravljena u BioRenderu (BioRender.com).

ADAR1-posredovan *A-to-I editing* ima važne biološke funkcije, naročito u posttranskripcijskoj regulaciji genske ekspresije (3). Osim što utječe na točnost translacije mRNA, ADAR1 također modulira put utišavanja RNA (eng. *RNA interference*) tako što utječe na procesiranje i ciljanje mikroRNA. Dodatno, *A-to-I editing* zabilježen je i u nizu virusnih genoma te se pokazalo da je ADAR1 važan efektor virusnih infekcija (4). Može izravno utjecati na ishod virusne infekcije uređivanjem virusne RNA ili neizravno uređivanjem stanične RNA, čime se mijenjaju stanični produkti koji naknadno utječu na interakciju virusa i stanice domaćina. Zanimljivo, ovisno o specifičnoj kombinaciji virusa i stanice domaćina, učinak ADAR1 proteina može biti provirusan ili antivirusan. Primjerice, selektivno uređivanje virusnih sekvenci može dovesti do virusu korisnih mutacija ili povećane translacije virusnih gena, što je zabilježeno za hepatitis delta virus (HDV) (5). ADAR1 posredovana konverzija A-u-I u HDV RNA pretvara UAG terminacijski kodon u UIG triptofanski kodon. Ova modifikacija omogućuje sintezu HDAg-L antigena koji je neophodan je za pakiranje HDV virusnih čestica. Nasuprot tomu, neselektivna hiperedicija virusnih genoma može dovesti do mutacija i destabilizacije RNA, što u konačnici ometa funkciju virusnih proteina. Također je moguće da ADAR1 funkcionira na način neovisan o uređivanju, koji uključuje stvaranje kompleksa između ADAR1 i drugih proteina ili vezanje nukleinskih kiselina putem Z- i dsRBD domena. Dodatno, jedan od predloženih mehanizma kojim ADAR1 djeluje na virusne infekcije i koji će biti istražen u ovom radu je modulacija urođenih imunskih odgovora.

1.2 Urođeni imunosni odgovor

Urođeni imunosni sustav prva je linija obrane organizma koja prepoznaje i brani se protiv patogena te služi kao most između početnog susreta s patogenom i naknadnog adaptivnog imunosnog odgovora. Ova brza i nespecifična obrana domaćina koristi specijalizirane receptore za prepoznavanje uzoraka (PRR, prema eng. *pattern recognition receptors*) za detekciju očuvanih molekularnih uzoraka patogena, poznatih kao molekularni obrasci povezani s patogenom (PAMP, prema eng. *pathogen associated molecular patterns*). Replikacija RNA virusa, pa čak i DNA virusa, rezultira stvaranjem dugih dvolančanih RNA (dsRNA). Kako se te dsRNA rijetko nalaze u citoplazmi zdravih stanica, senzorni sustavi urođene imunosti evoluirali su da ih detektiraju kao PAMP. Prepoznavanje dsRNA od strane **MDA5** (eng. *melanoma differentiation-associated protein 5*) i **RIG-I** (eng. *retinoic acid-inducible gene 1*), članova obitelji receptora sličnih RIG-I (RLR, prema eng. *RIG-I-like receptors*), praćeno je aktivacijom mitohondrijskog antivirusnog signalnog proteina (**MAVS**). MAVS zatim regrutira TANK-vezujuću kinazu 1 (**TBK1**) i IKK kinaze, što rezultira aktivacijom **IRF3** i **NF-κB** transkripcijskih faktora te indukcijom ekspresije interferona tip I (IFN-I), uglavnom IFN-β, i protuupalnih citokina. IFN-I vežu se za svoje receptore na zaraženim i susjednim stanicama, pokrećući signalnu kaskadu koja dovodi do transkripcije stotina gena stimuliranih interferonom (ISG, prema eng. *interferon-stimulated genes*). ISG imaju širok raspon protuvirusnih funkcija, uključujući inhibiciju virusne replikacije, degradaciju virusnih komponenti i modulaciju imunosnih odgovora. Jedan od ISG produkata, protein kinaza R (**PKR**) također detektira virusnu dsRNA u citoplazmi. Uslijed vezanja dsRNA, PKR kinaza prolazi proces dimerizacije i autofosforilacije, nakon čega fosforilira alfa podjedinicu eukariotskog inicijacijskijskog faktora 2 (**eIF2α**). Fosforilacija eIF2α faktora rezultira prekidom translacije proteina i pokreće autofagiju. Slično PKR-u, **OAS1** (eng. *2'-5'-oligoadenylate synthetase 1*) također je IFN-inducibilni antivirusni senzor koji reagira na dsRNA. Nakon vezanja dsRNA, OAS1

prolazi kroz konformacijsku promjenu i sintetizira 2',5'-oligoadenilate (2-5A). Ovi sekundarni glasnici zatim aktiviraju latentnu RNazu L koja cijepa virusne i endogene RNA, inhibirajući replikaciju virusa. Dodatno, u infekcijama DNA virusima, ciklička gvanozin monofosfat-adenozin monofosfat sintaza (**cGAS**, prema eng. *cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase*) otkriva virusnu dvolančanu DNA i aktivira **STING** (eng. *stimulator of interferon genes*), što dovodi do regrutiranja TBK1 i IKK kinaze te indukcije ekspresije IFN-I i drugih citokina. Uslijed vezanja dvolančane DNA, cGAS prolazi kroz konformacijsku promjenu i sintetizira ciklički GMP-AMP (cGAMP) iz ATP-a i GTP-a. cGAMP se zatim veže za i inducira konformacijsku promjenu STING-a, što dovodi do njegove aktivacije i naknadne transdukcije signala. Opisani signalni putevi prikazani su na slici 2. A.

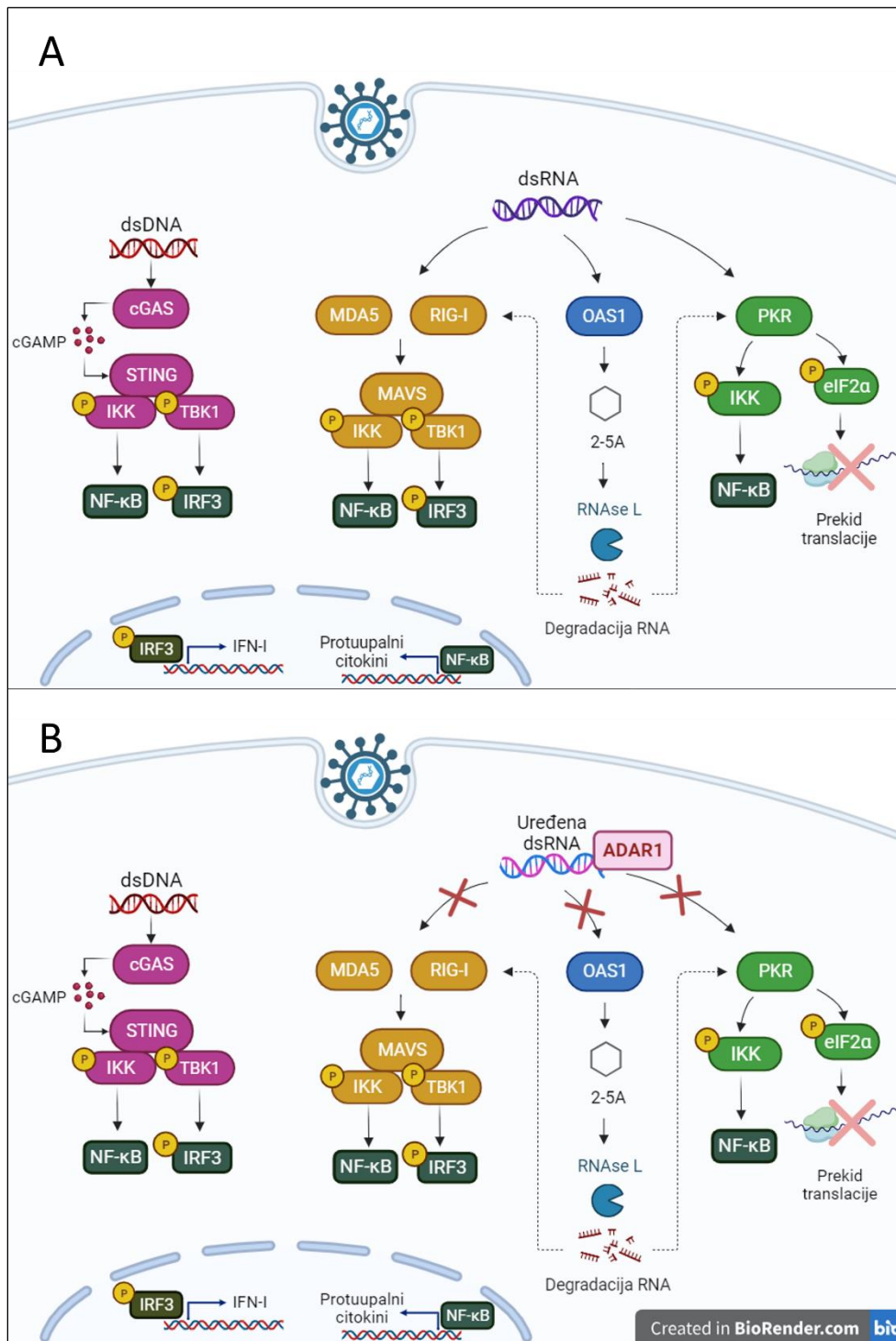
1.2.1 ADAR1 kao ključni regulator urođene imunosti

Budući da endogene RNA također mogu formirati dsRNA i imaju ispravnu strukturu za aktiviranje PRR-ova, nužno je postojanje mehanizma koji sprječava njihovu nepotrebnu aktivaciju u normalnim okolnostima. Upravo ADAR1 kroz svoju *A-to-I editing* aktivnost vlastitih dsRNA sprječava ovaj nepoželjan autoimuni odgovor (6). Ova spoznaja proizašla je iz istraživanja koja su otkrila da RIG-I i MDA5 senzori preferiraju vezanje dsRNA s nepodudarnim I-U bazama, umjesto dsRNA s adenozinima. Analizom fenotipa modelnih organizmima kojima nedostaje ADAR1 gen, utvrđeno je da je ADAR1 ključni supresor interferonske signalizacije, središnjeg efektorskog mehanizma urođene imunosti. Miševi homozigotni za *ADAR1 null* mutaciju umiru u embrionalnim danima 11,5-12,5 uslijed abnormalne ekspresije interferona i defekta u hematopoezi (7). Kasnije studije pokazale su da se smrtnost *Adar*^{-/-} embrija može spriječiti brisanjem MAVS-a ili MDA5, dok brisanje RIG-I ne spašava smrtnost i upalne reakcije (8). Ovi rezultati su pokazali da ADAR1 može blokirati interferonsku signalizaciju kroz MDA5-MAVS-IRF3 signalni put. U skladu s

embrionalnim $Adar^{-/-}$ mišjim modelom, identificirane su i prirodne mutacije u ADAR1 kod ljudi s Aicardi-Goutièresov sindromom (AGS) (9). AGS je rijetka i često fatalna dječja encefalopatija karakterizirana povišenim razinama interferona.

Obzirom na svoju ulogu u supresiji urođenih antivirusnih odgovora, ADAR1 se pokazao kao provirusni faktor u različitim virusnim infekcijama. Naime, brojni virusi iskorištavaju ADAR1 kako bi izbjegli imunosni nadzor i poboljšali svoju replikaciju. To uključuje virus ospica, virus humane deficijencije, virus vezikularnog stomatitisa i druge. Istraživanje Samuela i suradnika (10) otkrilo je smanjenu replikaciju virusa i pojačanu apoptozu u ljudskim HeLa stanicama s nedostatkom ADAR1 nakon infekcije virusom ospica. Provirusna i antiapoptotička aktivnost ADAR1 u ovim stanicama korelirala je s pojačanom aktivacijom PKR kinaze i IRF3 faktora. Provirusni učinak ADAR1 proteina zabilježen je i u infekciji virusom humane imunodeficijencije tip 1 (HIV-1) (11). Kao i u slučaju infekcije virusom ospica, indukcija ekspresije HIV-1 bila je povezana sa smanjenjem aktivacije PKR. ADAR1 također pojačava replikaciju vezikularnog stomatitisa virusa (12) i humanog T-staničnog leukemija virusa tip 1 i 2 putem inhibicije PKR i supresije fosforilacije eIF2 α (13). Zanimljivo, u infekciji hepatitis C virusom (HCV) povećana aktivnost PKR korisna je za replikaciju virusa, jer PKR-posredovano zaustavljanje translacije selektivno blokira translaciju proteina domaćina, dok inicijacija translacije HCV RNA nije pogođena (14). Sukladno tomu, čini se da ADAR1 ima antivirusno djelovanje u HCV infekciji koje se postiže ograničavanjem PKR-posredovanog zaustavljanja translacije. ADAR1 mogao bi imati antivirusni učinak i u infekciji Ebola virusom, uslijed akumulacije ADAR1-posredovanih hipermutacija virusnog genoma (15) te Influenza A virusom (IAV), uslijed editiranja virusne RNA od strane nuklearnog ADAR1 p110 (16). Međutim, ADAR1 p150 izoform djeluje provirusno za IAV jer blokira RIG-I-MAVS-IRF3 signalni put. Unatoč velikoj pozornosti koja je posvećena identificiranju

funkcije ADAR1 u biologiji virusa, njegova uloga u infekciji herpes simpleks 1 virusom još nije istražena.



Slika 2. Interakcija ADAR1 proteina i signalnih puteva urođene imunosti nakon infekcije virusom. (A) Urođeni imunološki senzori poput MDA5, RIG-I, PKR i cGAS aktiviraju se nakon prepoznavanja viruse RNA ili

DNA u citoplazmi, što zauzvrat aktivira NF- κ B put koji rezultira ekspresijom protuupalnih citokina. Dodatno, aktivacija MDA5-RIG-I i cGAS-STING signalnih puteva pokreće IFN odgovor preko TBK1 kinaze i IRF3 transkripcijskog faktora. Istovremeno, aktivirani PKR fosforilira eIF2 α , uzrokujući zaustavljanje translacije mRNA. Oligoadenilatna sintetaza 1 (OAS)-RNase L put se aktivira nakon detekcije dsRNA. OAS1 proizvodi 2',5'-oligoadenilate (2-5A) koji aktivira RNazu L, uzrokujući cijepanje virusne RNA. **(B)** ADAR1 je negativni regulator imunskih odgovora. Slika je napravljena u BioRenderu.

1.3 Herpes simpleks virus tip 1

Herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1) široko je rasprostranjen ljudski DNA virus iz porodice *Herspesviridae*. Blisko je povezan s HSV-2, drugim humanim herpesvirusom odgovornim za genitalni herpes. HSV-1 prvenstveno se prenosi izravnim kontaktom sa zaraženim osobama, obično putem sline. HSV-1 infekcija vrlo je raširena diljem svijeta. Procjenjuje se da je otprilike dvije trećine svjetske populacije zaraženo s HSV-1 (17). Virus se najčešće stječe tijekom djetinjstva te uzrokuje doživotnu infekciju zbog svoje sposobnosti latencije. Većina zaraženih osoba ostaje asimptomatska ili ima blage simptome poput oralnog herpesa. Međutim, infekcija može dovesti i do ozbiljnih bolesti kao što je herpes keratitis, vodećeg uzroka infektivne sljepoće i herpes simpleks encefalitis, rijetke, ali ozbiljne upale mozga.

Glavne karakteristike herpesvirusa su kodiranje za velik broj enzima uključenih u metabolizam i sintezu DNA, replikacija DNA i sklapanje virusne čestice u jezgri, razaranje inficirane stanice kod produktivne infekcije i uspostavljanje latentne infekcije kao mehanizam doživotne perzistentne infekcije. Herpesvirusi imaju karakterističnu strukturu viriona, koja se sastoji od velikog linearnog dvolančanog genoma DNA (152 kb u HSV-1) zatvorenog u ikosaedralnu kapsidu okruženu proteinskom strukturom koja se naziva *tegument* i ovojnice s virusnim glikoproteinima na površini. HSV-

1 ima složen ciklus replikacije koji uključuje litičku (produktivnu) fazu i latenciju. Primarno mjesto infekcije je epitel kože ili sluznica, često u orolabijalnom području, gdje virus započinje svoju produktivnu fazu infekcije. Tijekom ove faze, virusni geni se eksprimiraju u strogo reguliranoj vremenskoj kaskadi koja se može podijeliti u tri faze: neposredno-rana (IE, prema eng. *immediate-early*), rana (E, prema eng. *early*) i kasna (L, prema eng. *late*). Prvo se eksprimiraju IE geni, čiji produkti služe različitim regulatornim funkcijama i zatim aktiviraju E gene. Većina ranih proteina uključena je u metabolizam nukleinske kiseline i replikaciju DNA. Nakon replikacije virusne DNA, eksprimiraju se L virusni geni koji većinom kodiraju proteine viriona. Virusna transkripcija, replikacija DNA i sklapanje kapside odvijaju se isključivo u jezgri zaražene stanice. Jednom kad je sastavljena nova virusna čestica, stanica domaćina se lizira kako bi se oslobodilo potomstvo virusa. Nakon produktivne infekcije, HSV-1 dospijeva do obližnjih neurona i uspostavlja latentnu infekciju u senzornim ganglijima, prvenstveno trigeminalnim ganglijima. Tijekom latencije, ekspresija virusnog genoma je ograničena i ne stvara se virusno potomstvo. Međutim, latentni genom zadržava sposobnost reaktivacije, koju mogu potaknuti različiti čimbenici, uključujući stres, imunosupresiju, hormonalne promjene ili druge infekcije. Reaktivacija je proces u kojem virus ponovno pokreće produktivnu infekciju, obično na ili blizu mjesta primarne infekcije.

2. Cilj rada

Prijašnja istraživanja pokazala su da je ADAR1 važan efektor virusnih infekcija. Ovisno o virusu, ADAR1 može djelovati provirusno ili antivirusno, a ovi učinci često su povezani s regulacijom ključnih puteva urođene imunosti koji se aktiviraju u odgovoru na virusnu infekciju. Pro- i antivirusne funkcije ADAR1 proteina dobro su istražene u infekcijama RNA virusnima, međutim uloga ADAR1 proteina u infekciji herpes simpleks virusom tip 1 (HSV-1) nije karakterizirana. Motivirani time, htjeli smo istražiti ulogu ADAR1 proteina u produktivnoj infekciji HSV-1, široko rasprostranjenom ljudskom patogenom poznatom po oralnom herpesu.

Konkretni ciljevi su bili:

1. Istražiti ulogu ADAR1 proteina u produktivnoj infekciji herpes simpleks virusom 1.
2. Istražiti niz puteva urođenog imuniteta tijekom HSV-1 infekcije koji uključuju ADAR1 protein.

3. Materijali i metode

3.1 Stanice

Humane embrionalne stanice bubrega (HEK293A, prema eng. *Human Embryonic Kidney Cells*) sa stabilnom delecijom ADAR1 (ADAR1 KO) te pripadajuće HEK293A kontrolne stanice (CTRL) dobivene su ljubaznošću prof. Jonathana Maelfaita (VIB-UGent Center for Inflammation Research, Ghent, Belgija). Stanice su uzgajane u DMEM mediju (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, PAN-biotech GmbH, Aidenbach, Njemačka) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (PAN-biotech GmbH, Aidenbach, Njemačka) i antibiotika penicilina i streptomicina. Stanice su čuvane na 37°C i 5% CO₂ i pasažirane svakih 3-5 dana pri čemu je korišten DPBS (eng. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, PAN-biotech GmbH, Aidenbach, Njemačka) i 2x tripsin (Gibco, Waltham, MA, SAD) za odvajanje stanica od podloge.

3.2 Ekstrakcija proteina i western blot

Uzori stanica inficiranih s HSV-1 soja KOS (dobiven ljubaznošću prof. Donald M. Coena, Harvard Medical School) dobiveni su ljubaznošću Mie Cesarec (Laboratorij za molekularnu virologiju, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci) te pripremljeni za Western blot analizu prema standardnoj proceduri. Ukratko, kako bi se ekstrahirali proteini, stanice su lizirane u RIPA puferu (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na deoksiholata, 0,1% SDS, 50 mM Tris (pH 8,0) i inhibitorima proteaze (cOmplete, Roche, Basel, Švicarska)), pomiješanim s 2x Laemmli puferom s β -merkaptoetanolom (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, SAD), i denaturirane 10 minuta na 95 °C. Proteini u smjesi razdvojeni su pomoću natrijev dodecil sulfat–poliakrilamidni gel elektroforeze (SDS-PAGE, prema eng. *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), korištenjem 10% akrilamidnog gela. Gelovi su punjeni s 10 ml uzoraka i voženi na 110 V 1 sat i 30 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim preneseni na nitroceluloznu membranu (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, SAD), pomoću

aparature za prijenos (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) i pufera za prijenos (25mM Tris, 12 mM glicin, 20% metanol). Nakon prijenosa na membranu, membrane su blokirane 30 minuta na sobnoj temperaturi u 5% nemasnom mlijeku (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) u 1X tris puferiranoj fiziološkoj otopini (TBS). Membrane su inkubirane preko noći na 4°C u otopini primarnih protutijela. Primarna protutijela i razrjeđenja korištena u eksperimentima bila su: **α-actin** (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) – 1:10000, **α-gC** (Abcam, Cambridge, UK) – 1:2000, **α-ICP4** (Abcam, Cambridge, UK) – 1:2000, **α-ADAR1** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-ADAR p150** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-PKR** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-PKR (phospho T446)** (Abcam, Cambridge, UK) – 1:1000, **α-eIF2α** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-phospho-eIF2α** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-TBK1** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-phospho-TBK1** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-MDA5** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-MAVS** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-NFκB p65** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-phospho-NFκB p65** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-IRF3** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:1000, **α-OAS1** (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) – 1:200. Nakon inkubacije primarnim protutijelima, membrane su isprane otopinom TBS-5% Tween (TBS-T) tri puta po 10 minuta. Primarna protutijela detektirana su pomoću kozjih α-zečjih ili α-mišjih sekundarnih protutijela konjugiranih s peroksidazom hrena, oba razrijeđena 1:2000 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, SAD). Membrane su inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi u otopini sekundarnih protutijela i zatim ponovno isprane 3 puta po 10 minuta s TBS-T-om. Proteini su vizualizirani pomoću Amersham ECL reagensa ili SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i ChemiDoc MP sistema (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD).

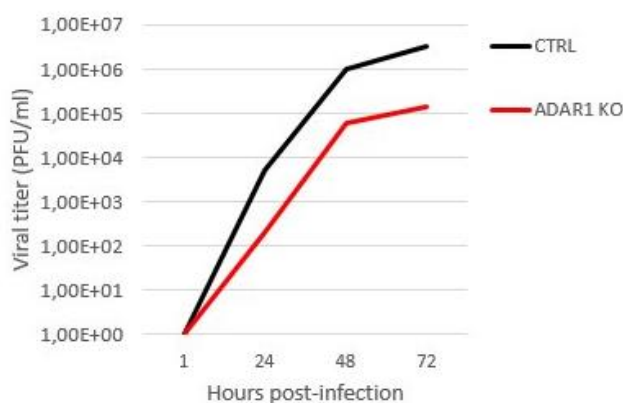
4. Rezultati

4.1 Replikacija HSV-1 virusa smanjena je u stanicama s nedostatkom ADAR1

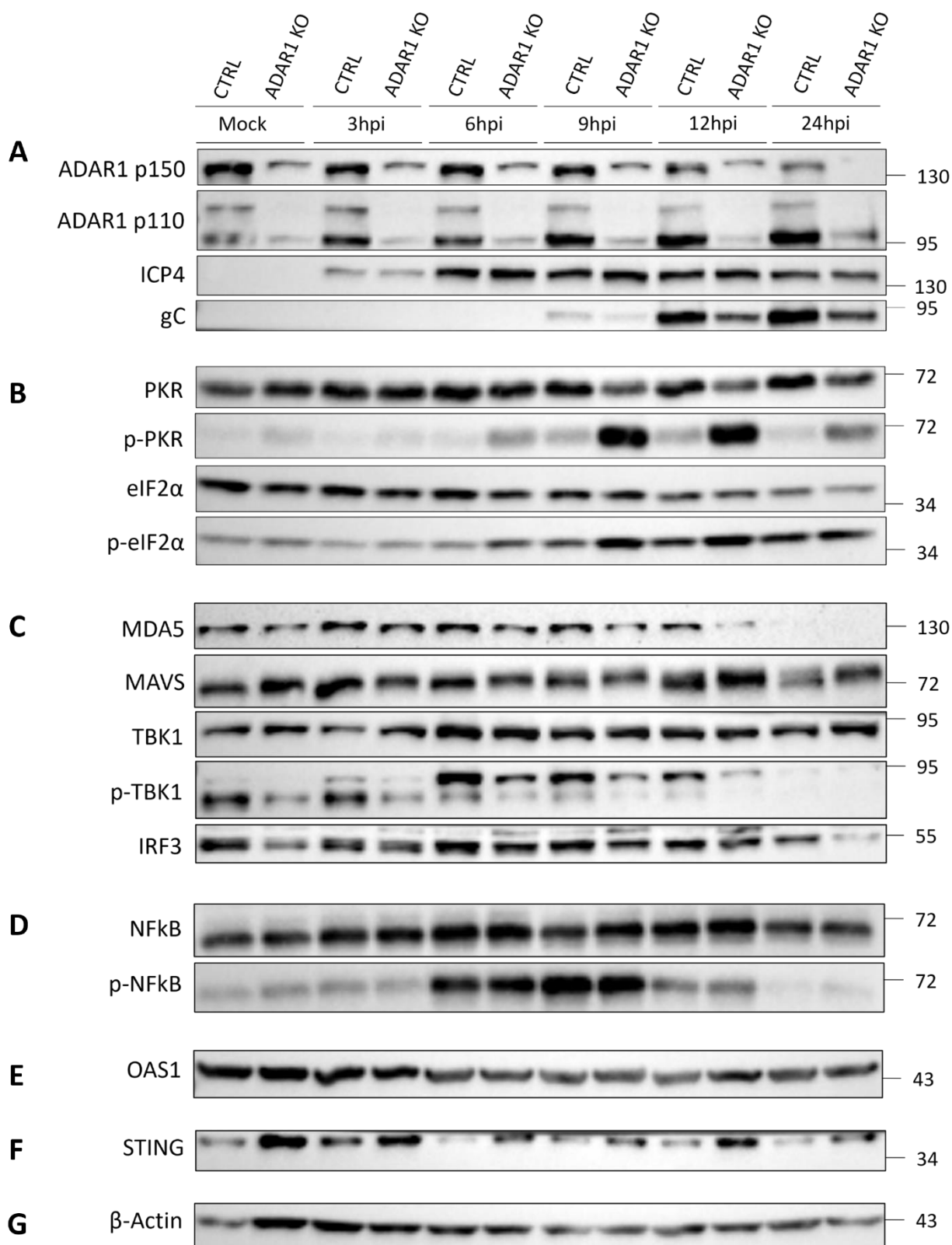
Kako bi istražili ulogu ADAR1 proteina u produktivnoj infekciji herpes simpleks virusom 1 (HSV-1), testirali smo sposobnost umnožavanja virusa u stanicama kojima nedostaje ADAR1 gen (ADAR1 KO) u odnosu na kontrolne stanice. Ukratko, KO i kontrolne stanice su inficirane s HSV-1 pri viskom MOI (eng. *multiplicity of infection*; i.e. broj virusa po stanici) te su uzorci za analizu sakupljeni u različitim vremenima nakon infekcije. Imunoblot analizom potvrdili smo da KO stanice ne ispoljavaju ADAR1 protein, uključujući interferon-inducibilnu ADAR-p150 i konstitutivno ispoljenu formu ADAR1-p110, odnosno da je gen za ADAR stabilno izbačen u ovim stanicama (Slika 4. A). Važno je napomenuti da su provedene brojne analize replikacije HSV-1 virusa u različitim uvjetima (ljubaznošću dr. Mie Cesarec) pri čemu je utvrđen smanjeni prinos HSV-1 (10-100x puta) u ADAR1 KO stanicama u usporedbi s kontrolnim stanicama. Reprezentativna analiza replikacije HSV-1 u ADAR1 KO stanicama tijekom 72 sata provedene pomoću standardnog plak testa prikazana je na slici 3 (slika 3.; Ljubaznošću dr. Mie Cesarec).

Nakon što smo pokazali da deficijencija ADAR1 uzrokuje replikacijski defekt HSV-1 virusa, htjeli smo isto potvrditi analizom ekspresije virusnih proteina. Prvo smo provjerili razine kasnog proteina glikoproteina C (gC). Rezultati su otkrili značajno smanjene ekspresije gC proteina u ADAR1 KO stanicama u usporedbi s kontrolom (Slika 4. A), što se slaže s rezultatima smanjene replikacije virusa u istoj staničnoj liniji. Budući da je gC kasni protein, njegova ekspresija postala je vidljiva tek u devetom satu nakon infekcije. Razlike u ekspresiji gC proteina između ADAR1 KO i CTRL stanica bile su posebno vidljive u dvanaestom i dvadeset četvrtom satu nakon infekcije. Također smo analizirali razine neposredno-ranog ICP4 (eng. *infected-cell polypeptide 4*) proteina, pošto je on ključan za transkripcijsku aktivaciju drugih virusnih gena. Međutim, ICP4 jednako se dobro ekspimirao u ADAR1

KO i CTRL stanicama (Slika 4. A), što ukazuje na to da ekspresija neposredno ranih gena nije znatno pogođena nedostatkom proteina ADAR1. Ovi rezultati zajedno pokazuju da ADAR1 pridonosi uspostavljanju učinkovite infekcije HSV-1.



Slika 3. ADAR1 pospješuje replikaciju HSV-1. Kontrolne HEK293 (CTRL) i ADAR1 KO stanice zaražene su s HSV-1 (MOI=5) i virusni titri izmjereni su u naznačenim točkama nakon infekcije. Prinos virusa prikazan je kao *plaque-forming units* po mL (PFU/mL).



Slika 4. ADAR1 utječe na ekspresiju proteina uključenih u puteve urođene imunosti tijekom HSV-1 infekcije. Kontrolne HEK293 (CTRL) ili ADAR1 KO stanice su bile *mock*-zaražene (odnosno nezaražene, Mock) ili

zaražene s HSV-1 pri MOI 5. Uzorci za analizu ekspresije proteina sakupljeni su u naznačenim vremenskim točkama nakon infekcije (hpi). (**A-G**) Western blot analiza niza proteina uključenih u puteve urođenog imuniteta. Analizirani proteini i njihova veličine u KDa naznačene su uz panele. CTRL – kontrolne stanice, ADAR1 KO – stanice s nedostatkom ekspresije ADAR1.

4.2 Provirusna uloga ADAR1 posredovana je supresijom fosforilacije PKR kinaze

Sljedeće je bilo za istražiti potencijalni mehanizam pomoću kojeg ADAR1 ostvaruje svoj provirusni efekt u HSV-1 infekciji. Razmotrili smo mogućnost da ADAR1 djeluje kroz modifikaciju ključnih signalnih puteva koji se aktiviraju u odgovoru na virusnu infekciju. Prvo smo provjerili status protein kinaze R (PKR), unutarstaničnog senzora dvolančanih RNA (dsRNA) koji zaustavlja sintezu proteina fosforilacijom α podjedinice eukariotskog inicijacijskog faktora 2 (eIF2 α). Rezultati western blot analize pokazali su da nedostatak ADAR1 proteina nije utjecao na bazalne razine PKR-a i eIF2 α tijekom 24 sata infekcije (Slika 4. B). Međutim, također smo provjerili razine njihovih fosforiliranih oblika (p-PKR i p-eIF2 α) koji ukazuju na aktivaciju PKR-a. Rezultati su otkrili da je razina p-PKR bila značajno veća u ADAR1 KO stanicama u usporedbi s kontrolom (Slika 4. B). Razlika u aktivaciji PKR-a bila je blago vidljiva već u trećem satu infekcije, postala je jača u šestom satu, dok je u osmom i dvanaestom satu bila najizraženija. Razlike u ekspresiji p-eIF2 α nisu bile toliko snažne, međutim nazirale su se jače razine proteina u ADAR1 KO staničnoj liniji kod devetog i dvanaestog sata. Ovi rezultati sugeriraju da nedostatak ADAR1 gena dovodi do pojačane aktivacije PKR kinaze u HSV-1 infekciji, što je u skladu s rezultatima istraživanja učinka uklanjanja ADAR1 kod infekcije s različitim RNA virusima (10–13). Pojačana fosforilacija PKR-a u ADAR1 KO stanicama korelira s pojačanom fosforilacijom eIF2 α što bi moglo voditi ka inhibiciji sinteze proteina te rezultirati smanjenim prinosima HSV-1 virusa.

4.3 Provirusni učinak ADAR1 na HSV-1 infekciju nije povezan s interferonskom signalizacijom i NF- κ B putem

Također nas je zanimalo hoće li nedostatak ADAR1 proteina utjecati na RLR signalni put, pošto je ADAR1 dokazani supresor IFN odgovora. Stoga smo odlučili provjeriti razine ekspresije dsRNA senzora MDA5, obzirom da njegova aktivacija inducira proizvodnju IFN putem aktivacije MAVS proteina i TBK1 kinaze. Međutim, ADAR1 KO nije doveo do pojačane ekspresije ovog citosolnog RNA senzora, kao ni njegovog nizvodnog partnera MAVS (Slika 4. C). Također nismo zabilježili razlike u razinama bazalnog TBK1. Međutim, kada smo provjerili ekspresiju fosforiliranog oblika TBK1 (p-TBK1) otkrili smo malo niže razine ekspresije u ADAR1 KO stanicama u usporedbi s kontrolom. Rezultati imunoblota IRF3 transkripcijskog faktora također nisu ukazali na ADAR1 posredovanu supresiju IFN odgovora u HSV-1 infekciji.

Aktivirani MAVS osim TBK1 kinaze također regrutira IKK kinazu koja fosforilira NF- κ B, što rezultira indukcijom protuupalnih citokina. U našem slučaju, aktivacija NF- κ B (praćeno analizom ekspresije fosforiliranog NF- κ B – p-NF- κ B) događa se oko šestog sata nakon infekcije HSV-1 (Slika 4. D). Ekspresija p-NF κ B bila je još jača u devetom satu te počela slabiti u dvanaestom. Međutim, nismo opazili razlike u aktivaciji NF- κ B puta između ADAR1 i CTRL stanica.

4.4 ADAR1 smanjuje ekspresiju STING proteina tijekom HSV-1 infekcije

Budući da je herpes simpleks 1 virus s dvolančanim DNA genomom, uzeli smo u obzir mogućnost da ADAR1 utječe na signalne puteve koji detektiraju virusnu DNA, prije svega cGAS-STING signalni put. Uistinu, rezultati western blot analize otkrili su da je razina proteina STING bazalno povećana u ADAR1 KO stanicama te da se jednakomjerno smanjuje tijekom 24 sata infekcije (Slika 4. E), kao i kod kontrolnih stanica. Ovaj rezultat bi mogao ukazivati na mogućnost da su KO stanice bazalno osjetljivije na aktivaciju

ovog signalnog puta, međutim nizvodni efektori (IRF3 i NF- κ B) ne ukazuju na tu aktivnost.

4.5 ADAR1 nema utječe na OAS1-RNaseL signalni put tijekom HSV-1 infekcije

ADAR1 se pokazao i kao regulator OAS-RNase L signalnog puta koji detektira i razgrađuje virusnu dsRNA (18). Zato smo odlučili istražiti kakav će učinak ADAR1 KO imati na OAS1 senzor u HSV-1 infekciji. Međutim, naši su rezultati pokazali da su razine OAS1 bile su jednake u ADAR1 KO i CTRL stanicama (Slika 4. F).

5. Rasprava

ADAR1, član obitelji ADAR proteina, uključen je u važne biološke procese uključujući uređivanje dsRNA, procesiranje mikroRNA i regulaciju urođene imunosti. Osim toga, pokazalo se da ADAR1 ima važne učinke u virusnim infekcijama, koji mogu biti provirusni ili antivirusni. Iako su uloge ADAR1 proteina dobro istražena u nizu RNA-virusnih infekcija, uloga ADAR1 u infekciji herpes simpleks 1 virusom (HSV-1) nije karakterizirana. Kako bi istražili ulogu ADAR1 proteina u produktivnoj HSV-1 infekciji, koristili smo HEK293 stanice sa stabilnom delecijom ADAR1 gena. Otkrili smo da ADAR1 omogućava efikasnu replikaciju HSV-1 (Slika 3). Ovi rezultati ukazuju na provirusnu ulogu ADAR1 tijekom produktivne HSV-1 infekcije koja se postiže PKR-posredovanom inhibicijom translacije proteina.

PKR je antivirusni protein koji igra ključnu ulogu u inhibiciji translacije kao odgovor na virusne dvolančane RNA. Budući da virusi koriste staničnu mašineriju za translaciju svojih proteina, PKR-posredovan prekid translacije narušava uspješnu replikaciju i širenje virusa. Supresija aktivacije PKR-a od strane ADAR1 prethodno je zabilježena u različitim virusnim infekcijama. Bilo bi zanimljivo utvrditi točan molekularni mehanizam koji stoji iza aktivacije ovog signalnog puta te je li učinak ADAR1 također povezan sa stvaranjem kompleksa između ta dva stanična proteina. U slučaju HIV-a, zabilježena je povećana interakcija između ADAR1 i PKR tijekom infekcije (11), što bi moglo ukazivati na to da ADAR1 izravno stupa u interakciju s PKR kako bi se spriječila njegova dimerizacija i naknadna autofosforilacija. Nadalje, tijekom infekcije VSV-a i HIV-a, utvrđeno je da se inhibitorni učinak ADAR1 na PKR neovisan o uređivanju već ovisi isključivo o vezanju za dsRNA (11,12). S druge strane, kod infekcije s virusom ospica aktivaciju PKR nije bilo moguće spasiti s ADAR1 mutantom s nedostatkom uređivanja RNA, što ukazuje da inhibicija PKR-a ovisi o RNA uređivanju, barem za virus ospica (19).

Ovo istraživanje predstavlja prvo istraživanje uloga proteina ADAR1 u infekciji HSV-1. Iako naši rezultati ukazuju na provirusnu funkciju ADAR1 tijekom produktivne faze infekcije, veliki broj pitanja ostaje otvoren ili je ovim istraživanjem potaknut. HSV-1, kao i svi herpesvirusi, ima replikaciju u dvije faze, produktivnu i latentnu, i uloge ADAR1 proteina za virusnu replikaciju mogle bi biti u potpunosti drugačije u različitim fazama.

6. Zaključak

Zaključno, u ovom radu izvješćujemo o provirusnoj ulozi ADAR1 tijekom HSV-1 infekcije. Naši rezultati sugeriraju da je funkcija ADAR1 potrebna za uspostavljanje učinkovite infekcije HSV-1 virusom. Predlažemo da se provirusna aktivnost ADAR1 postiže supresijom puteva urođene imunosti, prije svega PKR-eIF2 α puta. Naša opažanja upućuju da bi virusi, uključujući HSV-1, mogli koristiti ADAR1 kako bi unaprijedili svoju replikaciju putem ciljanog iskorištavanja sposobnosti ADAR1 u suzbijanju protuvirusnih puteva domaćina. Ove spoznaje pridonose dubljem razumijevanju interakcija između virusa i domaćina te otvaraju nove perspektive za istraživanje i bolje razumijevanje mehanizama infekcije.

7. Literatura

1. Bass BL, Weintraub H. A developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes. *Cell*. 1987 Feb 27;48(4):607–13.
2. Wagner RW, Smith JE, Cooperman BS, Nishikura K. A double-stranded RNA unwinding activity introduces structural alterations by means of adenosine to inosine conversions in mammalian cells and *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci*. 1989 Apr 1;86(8):2647–51.
3. Mannion N, Arieti F, Gallo A, Keegan LP, O'Connell MA. New Insights into the Biological Role of Mammalian ADARs; the RNA Editing Proteins. *Biomol* 2015, Vol 5, Pages 2338-2362. 2015 Sep 30;5(4):2338–62.
4. 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.
5. Casey JL. RNA editing in hepatitis delta virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;307:67–89.
6. Liddicoat BJ, Chalk AM, Walkley CR. ADAR1, inosine and the immune sensing system: distinguishing self from non-self. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016 Mar 1;7(2):157–72.
7. Wang Q, Miyakoda M, Yang W, Khillan J, Stachura DL, Weiss MJ, et al. Stress-induced Apoptosis Associated with Null Mutation of ADAR1 RNA Editing Deaminase Gene. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4952–61.
8. Pestal K, Funk CC, Snyder JM, Price ND, Treuting PM, Stetson DB. Isoforms of RNA-Editing Enzyme ADAR1 Independently Control Nucleic Acid Sensor MDA5-Driven Autoimmunity and Multi-organ Development. *Immunity*. 2015 Nov 17;43(5):933–44.
9. Rice GI, Kasher PR, Forte GMA, Mannion NM, Greenwood SM, Szykiewicz M, et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1243.
10. Toth AM, Li Z, Cattaneo R, Samuel CE. RNA-specific Adenosine Deaminase ADAR1 Suppresses Measles Virus-induced Apoptosis and Activation of Protein Kinase PKR *. 2009;
11. Clerzius G, Gélinas J-F, Daher A, Bonnet M, Meurs EF, Gatignol A. ADAR1 Interacts with PKR during Human Immunodeficiency Virus Infection of Lymphocytes and Contributes to Viral Replication. *J Virol*. 2009 Oct;83(19):10119–28.
12. Nie Y, Hammond GL, Yang J-H. Double-Stranded RNA Deaminase ADAR1 Increases Host Susceptibility to Virus Infection. *J Virol*. 2007 Jan 15;81(2):917–23.
13. Cachat A, Alais S, Chevalier AS, Journo C, Fusil F, Dutartre H, et al. ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication through inhibition of PKR activity. *Retrovirology*. 2014 Nov 12;11(1):1–15.
14. Garaigorta U, Chisari F V. Hepatitis C Virus Blocks Interferon Effector Function by Inducing Protein Kinase R Phosphorylation. *Cell Host Microbe*.

2009 Dec 17;6(6):513–22.

15. Whitfield ZJ, Prasad AN, Ronk AJ, Kuzmin I V., Ilinykh PA, Andino R, et al. Species-Specific Evolution of Ebola Virus during Replication in Human and Bat Cells. *Cell Rep.* 2020 Aug 18;32(7):108028.
16. Vogel OA, Han J, Liang CY, Manicassamy S, Perez JT, Manicassamy B. The p150 isoform of ADAR1 blocks sustained RLR signaling and apoptosis during influenza virus infection. *PLoS Pathog.* 2020 Sep 8;16(9):e1008842.
17. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence.* 2021;12(1):2670–702.
18. Li Y, Banerjee S, Goldstein SA, Dong B, Gaughan C, Rath S, et al. Ribonuclease I mediates the cell-lethal phenotype of double-stranded RNA editing enzyme ADAR1 deficiency in a human cell line. *Elife.* 2017 Mar 31;6.
19. Okonski KM, Samuel CE. Stress Granule Formation Induced by Measles Virus Is Protein Kinase PKR Dependent and Impaired by RNA Adenosine Deaminase ADAR1. *J Virol.* 2013 Jan 15;87(2):756–66.