

Uloga proteina ADAR1 u replikaciji humanoga herpes virusa 8 (HHV-8)

Fadiga, Hana

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:225655>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**

Repository / Repozitorij:



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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Hana Fadiga

**Uloge proteina ADAR1 u replikaciji humanoga herpes virusa 8
(HHV-8)**

Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Hana Fadiga

**Uloge proteina ADAR1 u replikaciji humanoga herpes virusa 8
(HHV-8)**

Završni rad

Rijeka, 2023.

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

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate university programme
„Biotechnology and drug research“

Hana Fadiga

Roles of ADAR1 protein in human herpes virus 8 (HHV-8) infection
Bachelor's thesis

Rijeka, 2023.

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

Završni rad obranjen je dana____11.srpnja 2023. __ pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Mladen Merćep–predsjednik povjerenstva
2. izv. prof. dr. sc. Nicholas Bradshaw- član
3. izv. prof. dr. sc. Igor Jurak-mentor

Rad ima 36 stranice, 12 slika i 36 literaturnih navoda

SAŽETAK

Jedna od najčešćih posttranskripcijskih modifikacija na dvolančanoj RNA (dsRNA) kod ljudi jest proces prelaska adenzina u inozin (A→I uređivanje). Deaminaciju kataliziraju adenzin deaminaze koje djeluju na RNA (ADAR). *ADAR* geni kodiraju četiri izoforme ADAR proteina: ADAR1-p110, ADAR1-p150, ADAR2 i ADAR3. Istraživanja su pokazala da je ekspresija ADAR1 na uređenim mjestima najviša zbog čega se smatra da ima ključnu ulogu u promjenama u ekspresiji RNA kao i njezinoj funkciji. Uređivanje A→I putem ADAR-a ima velik učinak na očuvanje stanične homeostaze, dok se abnormalnosti u uređivanju povezuju s patogeneom brojnih bolesti, uključujući autoimune bolesti i tumore. ADAR svoju ključnu ulogu pokazuje u regulaciji imunološkoga odgovora domaćina i kontroliranju replikacije virusa. Ovisno o specifičnome virusu te kombinaciji stanica domaćina, uređivanje može imati provirusne ili antivirusne učinke. Kaposijev sarkom povezan s herpesvirusom (KSHV) primjer je virusa kod kojega ADAR1 ima provirusni učinak. KSHV je dvolančani DNA virus povezan s Kaposijevim sarkomom (KS), primarnim efuzijskim limfomom (PEL) i multicentričnim Castlemanovom bolešću (MCD) koji tijekom svojega životnog ciklusa prolazi kroz dvije faze: latentnu i litičku. Tijekom latentne faze ekspresija gena je uvelike ograničena. Uređivanje jednoga od transkripata ekspresioniranoga u latentnoj fazi, K12 RNA, s pomoću ADAR1 eliminira njegov onkogeni potencijal. Nakon reaktivacije KSHV-a slijedi litička faza kada se ekspresija gena povećava i aktivira se urođeni imunološki odgovori domaćina koji sprječava replikaciju virusa. S obzirom na to da je reaktivacija povezana s aktivnošću interferona (IFN) te ADAR1 utječe na nju, dovodi se u pitanje ako ADAR1 kontrolira aktivaciju signalnoga puta receptora sličnih RIG-u (RLR). Potvrđeno je da povećane razine ADAR1 proteina smanjuje urođeni imunološki odgovori na RNA što utječe na proliferaciju virusa.

Ključne riječi: adenzin deaminaze koje djeluju na RNA (ADAR), A→I uređivanje, Kaposijev sarkom povezan s herpesvirusom (KSHV), provirusni učinak

SUMMARY

One of the most common post-transcriptional modifications of double-stranded RNA (dsRNA) in humans is the conversion of adenosine to inosine (A→I editing). Deamination is catalyzed by RNA-acting adenosine deaminase (ADAR). ADAR genes encode four isoforms of ADAR proteins. ADAR1-p110, ADAR1-p150, ADAR2, and ADAR3. According to studies, ADAR1 expression is more abundant in regulatory locations, indicating that ADAR1 is crucial for modifying RNA expression and function. The cellular homeostasis-maintaining role of A-I editing by ADARs is significant, while abnormal editing is thought to play a role in the development of a wide range of illnesses, including cancers and autoimmune diseases. ADARs are crucial for controlling viral replication and modulating host immunological responses. Editing can have proviral or antiviral effects, depending on the particular virus and host cell combination. A virus in which ADAR1 has a proviral effect is Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). KSHV is a double-stranded DNA virus that goes through two stages of its life cycle: latent and lytic phase. It is linked to Kaposi sarcoma (KS), primary effusion lymphoma (PEL), and multicentric Castleman disease (MCD). During latency, gene expression is severely restricted. Editing of K12 RNA, one of the latently expressed transcripts, by ADAR1, eliminates its oncogenic potential. KSHV reactivation is followed by a lytic phase, during which the host's innate immune response is triggered and gene expression rises, allowing the virus to proliferate. Since reactivation of the RIG-like receptor (RLR) signaling pathway is linked to IFN activity, which ADAR1 affects, it has been questioned if ADAR1 regulates it. It has been shown that elevated ADAR1 protein levels diminish innate immune responses to RNAs that affect viral replication.

Key words: Adenosine deaminases acting on RNA (ADAR), A→I editing, Kaposi's sarcoma associated with herpesvirus (KSHV), proviral effect

SADRŽAJ

UVOD	1
SVRHA RADA.....	4
ADAR	5
A→I UREĐIVANJE.....	6
<i>ADAR1</i>	<i>9</i>
<i>ADAR2.....</i>	<i>11</i>
<i>ADAR3.....</i>	<i>12</i>
<i>Bolesti uzrokovane nedostatkom ADAR1 funkcija</i>	<i>14</i>
KSHV.....	16
<i>Životni ciklus KSHV-a.....</i>	<i>17</i>
Razvoj infekcije.....	19
Urođeni imunološki odgovor.....	20
IZBJEGAVANJE IMUNOLOŠKOGA ODGOVORA S POMOĆU ADAR PROTEINA	23
<i>Uređivanje ORF K12</i>	<i>24</i>
<i>Uloga ADAR1 u RLR signalnome putu.....</i>	<i>25</i>
<i>Primarni efuzijski limfom</i>	<i>28</i>
<i>Uređivanje KSHV miRNA.....</i>	<i>30</i>
POPIS LITERATURE.....	34
ŽIVOTOPIS	37

UVOD

Herpesvirusi su velika obitelj virusa koji pripadaju obitelji *Herpesviridae*. Riječ je o dvolančanim DNA virusima koji su široko rasprostranjeni u prirodi te zahvaćaju različite vrste, uključujući ljude i druge sisavce. Obitelj herpesvirusa podijeljena je u tri skupine na temelju svojih značajka i interakcija s domaćinima: alfaherpesvirusi, betaherpesvirusi i gamaherpesvirusi. ¹ Alfaherpesvirusi u koje spada herpes simplex virus tipa 1 i 2 (HSV) i virus varicella-zoster (VZV), poznati po kratkome replikacijskom ciklusu i širokom rasponu domaćina koje mogu zaraziti. Betaherpesvirusi, poput citomegalovirusa (CMV) i humanoga herpesvirusa 6 i 7 (HHV-6 i HHV-7), imaju duži replikacijski ciklus, no sposobnost zaraziti samo određeni raspon domaćina. Gamaherpesvirusi, uključujući Epstein-Barr virus (EBV) i ljudski herpesvirus 8 (HHV-8), imaju vrlo ograničen raspon domaćina te ih karakterizira jedinstvena interakcija s imunološkim sustavom domaćina.

Virusi su uključeni u regulaciju ekspresije gena domaćina na različite načine.² Jedan je od ključnih mehanizama kojim se virusi koriste za kontrolu ekspresije gena je optimizacija modifikacije strukture i funkcije RNA. Osim što utječe na ekspresiju gena promjenama na razini kromatina i DNA, virusi su tijekom evolucije razvili učinkovite mehanizme koji reguliraju ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini. To znači da virusi djeluju na molekule RNA nakon što su one sintetizirane iz genetskoga materijala.

Kao što je deaminacija adenoza u inozin (A→I uređivanje) izrazito važna za domaćina, taj proces ima važnu ulogu u replikaciji virusa, međutim nedovoljno je istražen kod virusa s genomom DNA. 1984. godine, istraživači O'Hara et al.³ proveli su prvu studiju koja je otkrila promjene A→I u virusima. Njihovo istraživanje bilo je usredotočeno na virus vezikularnoga stomatitisa (VSV), kod kojeg su uočili promjene u RNA, posebice u transkriptima virusne mRNA. Te su modifikacije rezultat

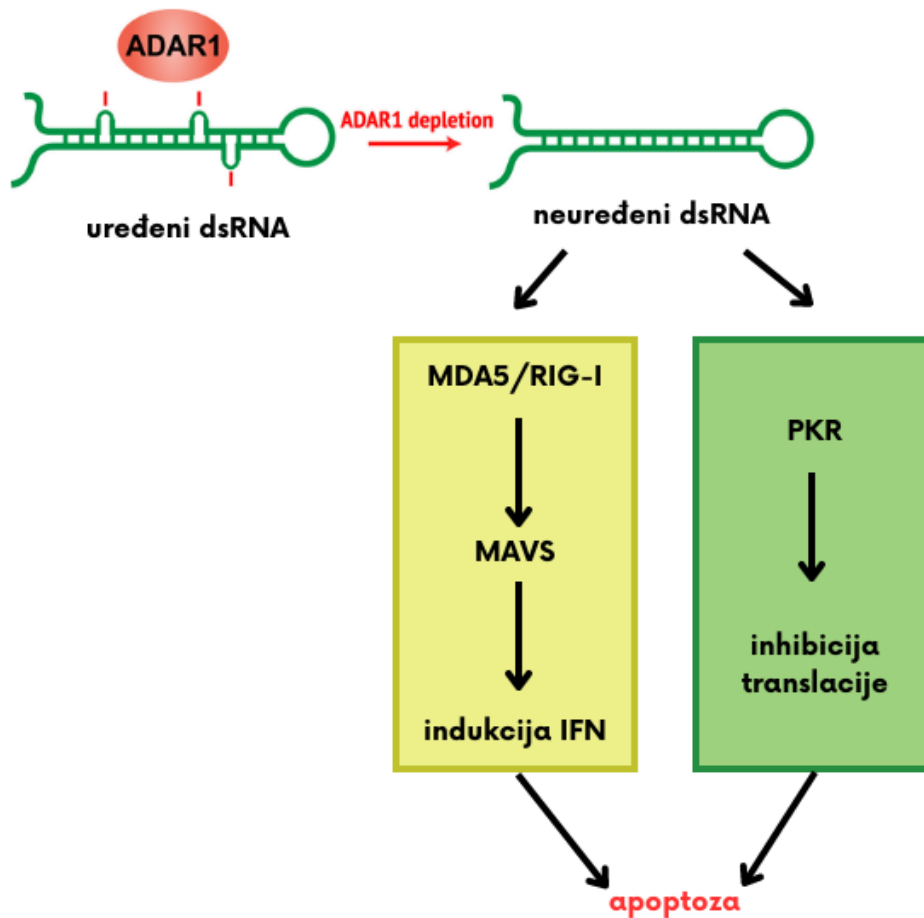
djelovanja enzima ADAR. Ta otkrića pružila su uvid u fenomen uređivanja RNA u virusima te u mehanizme izražavanja gena i prilagodbe virusa.

Ovisno o specifičnome virusu može doći do pojačane ili smanjene replikacije virusa. Kod virusa hepatitisa C (HCV), virusa limfocitnoga koriomeningitisa (LCMV) te poliomavirusa ADAR pokazuje antivirno djelovanje. Suprotno tomu, ADAR1 se, putem ometanjem senzora DNA suprotstavlja urođenomu imunološkom odgovoru, što dovodi do smanjenja učinkovitosti borbe protiv provirusnih infekcija. Takav efekt vidljiv je kod nekoliko vrsta: Epstein-Baar virusa (EBV), respiratornoga sincicijskog virusa (RSV), virusa humane imunodeficijencije tipa I (HIV-1), virus ospica (MV) te Kaposijeva sarkoma povezanoga s herpesvirusom (KSHV).⁴ U nekim slučajevima, njegova uloga može biti i pro- i antivirusna, što dovodi do optimalne replikacije kao što je viđeno u slučajevima HIV-1 te virusa hepatitisa D (HDV), MV i VSV.

Dva su glavna mehanizam kojim ADAR1 utječe na virusnu replikaciju: RNA uređivanje i inhibicija aktivirane dsRNA proteinske kinaze (PKR). Iako putevi nisu povezani, mogu djelovati zajedno kako bi povećali virusnu replikaciju i doprinijeli virusnoj patogenezi. PKR, IFN-inducirana kinaza, ima ključnu ulogu u stanične odgovoru na virusnu infekciju. Kad ga aktivira dsRNA, što označava prisutnost virusa, PKR fosforilira ciljane proteine čime dolazi do inhibicije sinteze proteina i pokretanja antivirusnog odgovora. Istraživanja su pokazala da se ADAR1 veže za prvu dsRNA vezujuću domenu (dsRBD) PKR-a, nakon čega slijedi njezina inhibicija i pojavljuje se provirusna aktivnost (Slika 1).⁴ Drugi mehanizam, RNA uređivanje, pronađeno je u većini virusa koji sadržavaju dsRNA bilo u kojoj fazi životnoga ciklusa. Jedan je od njih HHV-8 odnosno Kaposijev sarkom povezan s herpesvirusom (KSHV).

KSHV obično zahvaća osobe s oslabljenim imunološkim sustavom, poput onih s AIDS-om. Kaposijev sarkom (KS), jedan od triju vrsta raka prouzročenih KSHV-om, četvrti je najčešći rak u svijetu izazvan infektivnim uzročnikom nakon raka želuca, vrata maternice i jetre.⁵

Naknadno je otkrivena uloga virusa u primarnome efuzijskom limfomu (PEL) kao i u multicentričnoj Castlemanovoj bolesti.



Slika 1 Uloga ADAR1 u regulaciji urođenoga imunološkog odgovora na dsRNA. Nakon deplecije ADAR1 proteina, neuređena dsRNA pokreće receptore za prepoznavanje uzoraka MDA5 i PKR koji aktiviraju antivirusne mehanizme (induciraju interferon, inhibiraju translaciju) koja u konačnici dovodi do apoptoze. (Preuzeto i modificirano od Song et al. ⁶)

SVRHA RADA

Cilj je ovoga znanstvenog rada bio definirati uloge adenzin deaminaza koje djeluju na RNA (ADAR) na Kaposijev sarkom povezan s herpesvirusom (KSHV, HHV-8). Raspravljat ćemo o tome kako ADAR1 utječe na dvije faze životnog ciklusa KSHV-a te kakav je njegov utjecaj na urođeni imunološki odgovor pri zarazi i u regulaciji signalnih puteva.

ADAR

Adenozin deaminaze koje djeluju na RNA, poznate pod imenom ADAR, skupina su proteina odgovornih za katalizu jedne od najčešćih posttranskripcijskih modifikacija u ljudi, prelazak adenozina u inozin (A→I uređivanje). 1987. godine otkriveno je da ADAR ima sposobnost odmatanja dsRNA u oocitima i jajima žaba afričke pandžašice (lat. *Xenopus laevis*).⁶ Nedugo nakon otkrića da je protein, danas poznat kao ADAR1, odgovoran za aktivnost odmatanja, otkrivena je i njegova sposobnost uređivanja A→I. Osim toga, otkrivena su i druga dva ADAR gena, ADAR2 i ADAR3, koji zajedno s ADAR1 čine obitelj ADAR gena u genomima sisavaca. Ti geni kodiraju tri različita ADAR proteina: dvije izoforme ADAR1, ADAR1-p150, ADAR1-p110, te ADAR2 i ADAR3.

Iako sve izoforme dijele slične domene, razlikuju se po unutarnjoj organizaciji. Svi ADAR geni sadržavaju dvolančanu domenu vezanja RNA (dsRBDs) koja je odgovorna za vezanje dsRNA. Dok ADAR1 i ADAR2 imaju aktivne deaminaze u C-terminalnoj regiji, ona kod ADAR3 ne pokazuje aktivnost no ima sposobnost inhibiranja aktivnih ADAR enzima. Izoforma ADAR1-p150 jedina je IFN-inducirana dok su ostali konstitutivno izraženi. Svi članovi ADAR obitelji, kao i posttranskripcijski mehanizam A→I uređivanja, viđeni su u svim skupinama višestaničnim životinja (lat. *Metazoa*), međutim nisu pronađeni u biljkama, kvascima ili gljivama.⁶ Vjeruje se da je prvi ADAR gen evoluirao iz tRNA-specifičnoga adenozin deaminaze progenitora (ADAT) stjecanjem dsRBD koje su mu omogućile rad na supstratima dsRNA.⁷

A→I UREĐIVANJE

A→I uređivanje odnosno prelazak adenzina u inozin posttranskripcijska je modifikacija koja uzrokuje C6 deaminaciju adenzina, odnosno gubitak amino skupine, pretvarajući ga u inozin. Članovi ADAR obitelji, to jest proteini koji vežu dsRNA, ključni su u kataliziranju toga procesa (Slika 2). Kao rezultat takvih modifikacija dolazi do promjena u strukturi molekule RNA s obzirom na to da se deaminizirani adenzin veže s citozinom umjesto s uracilom, a par nepodudarnosti inozin-uracil manje je stabilan od para adenzin-uracil. Taj proces osim što potiče znatne promjene u stanicama, utječe i na procese koji ovisne o sekvenci, kao što su dekodiranje glasničkoga RNA (mRNA), spajanje prekursora mRNA, replikacija RNA-ovisne virusne polimeraze te na mnoge druge, no mijenja se i funkcija nekodirajućih RNA kao što je transporna RNA (tRNA), ribosomalna RNA (rRNA) te male RNA (npr. mikroRNA, siRNA...). Modifikacije su vidljive i kod proteina koje uređeni transkripti kodiraju. Promjene u kodonskome nizu mogu stvoriti drukčiji triplet kodona čime potencijalno utječu na strukturu i funkciju kodirajućega proteina. Osim promjena koje ovise o sekvenci, ADAR enzimi također mogu utjecati na procese koji su neovisni o strukturi RNA. Kod eukariota mogu utjecati na aktivaciju dsRNA senzora koji pokreću antivirne odgovore protiv RNA i DNA virusa (Slika 3).

Q/R mjesto, gdje pri uređivanju dolazi do promjene glutamina u arginin. Uređivanje i alternativno spajanje stvara raznolikost podjedinice glutamatskoga receptora koji je potreban za normalan razvoj i funkciju mozga.⁸ ADAR1 i ADAR2 mogu učinkovito uređivati GluR-B pre-mRNA na R/G mjestu *in vitro* dok Q/R mjesto uređuje samo ADAR2.



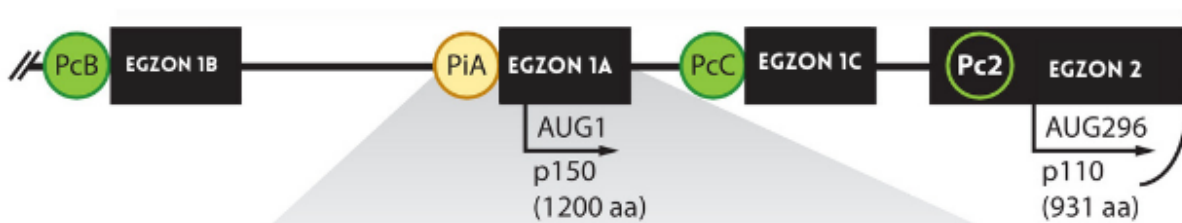
Slika 3 : Shematski prikaz biokemijskih mehanizama A → I uređivanja s pomoću ADAR-a. Ono može utjecati na ekspresiju gena i funkciju proteina (Preuzeto i modificirano Samuel et al.⁹)

ADAR1

ADAR1 gen jedini je koji kodira dvije enzimski aktivne izoforme proteina. Jedna je od tih izoforma *ADAR1-p150*, koji je jedini protein koji je induciran interferonom, a nalazi se primarno u citoplazmi. Druga izoforma, *ADAR1-p110*, konstitutivno je izražen protein koji se pretežito nalazi u jezgri.¹⁰

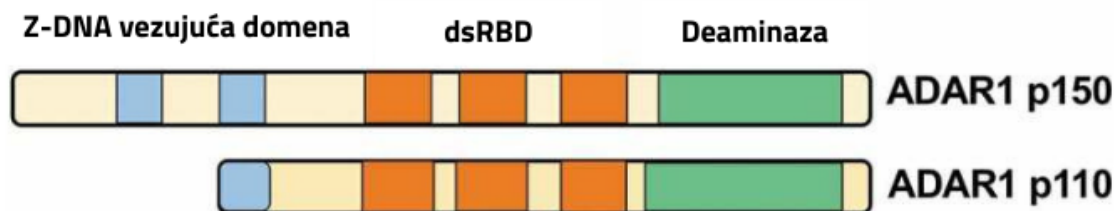
ADAR1 je uvelike odgovoran za većinu A→I uređivanja uključujući hiperuređivanje virusnih i kružnih RNA. Pri analiziranju uređivanja RNA s pomoću *ADAR1* nultih stanica rekonstruiranih s p150 ili p110 utvrđeno je da p150 uređuje više od polovice uređenih mjesta dok je druga polovica uređivana s pomoću ili p150 ili p110. Istraživanjima je potvrđeno da genetska ablacija funkcije *ADAR1* gena kod miševa remećenjem ili ekspresije samoga p150 proteina ili kombinacijom p110 i p150, ili ubacivanjem katalitički mrtvoga mutanta dovodi do smrti embrija.

Lokus *ADAR1* gena kod ljudi je na dužemu kraku q21 kromosoma 1 (1q21), čiji se zreli transkript sastoji od 15 egzona.¹⁰ Glavnu ulogu u ekspresiji imaju četiri alternativna promotora. Jedan od njih je IFN-induciran, PiA, dok su ostala tri, PcB, PcC i Pc2, konstitutivno aktivni (Slika 4). Aktivacija PiA promotora potiče sintezu alternativnoga egzona 1A, transkripta koji uključuje egzon 7b. Taj transkript kodira *ADAR1-p150* protein s 1200 aminokiselinskih ostataka, pri čemu AUG1 na egzonu 1A označava početak translacije. S druge strane, alternativni egzoni 1B i 1C ne sadržavaju AUG sekvence, ali imaju važnu ulogu u aktivaciji ekspresije transkripta koji započinje translaciju *ADAR1-p110* proteina s 931 aminokiselinskih ostataka. Taj protein počinje od AUG296 prisutnoga na egzonu 2. mRNA koja sadržava egzon 1A optimizirana je za izražavanje i p150 i p110 proteina, dok se većina p110 proteina sintetizira iz mRNA koja sadržava egzon 1B ili 1C.



Slika 4 **Organizacija ljudskoj ADAR1 proteina.** Ekspresija ADAR1-p150 proteina inicirana je interferon induciranim alternativnim promotorom PiA (označeno žutim krugom) dok su za ekspresiju ADAR1-p110 potrebna tri konstitutivno aktivna alternativna promotora PcB, PcC i Pc2 (označeno zelenim krugom). (Preuzeto i modificirano od Pfaller et al.¹⁰)

Iako obje izoforme ADAR1-p150 i ADAR1-p110 unutar C-terminalne regije posjeduju deaminaznu katalitičku domenu te unutar N-terminalne regije sadržavaju tri kopije dsRNA-vezujuće domene (RI, RII, RIII). Razlikuju se po Z-DNA-vezujućoj domeni (engl. *Z-DNA binding domain*, ZDBD), koja se nalazi unutar N-terminalne regije (Slika 5). ZDBD prvi je put identificirana u ljudskome ADAR1 te njezina funkcija do nedugo nije bila poznata. Novija istraživanja pokazuju ulogu u regulaciji stanične smrti u interakciji s proteinom Z-DNA-vezujućim proteinom 1 (engl. *Z-DNA-binding protein 1*, ZBP1). ZBP1 senzor aktivira inflamatoski kompleks NLRP3 koji dovodi do PANoptoze odnosno puta upalne stanične smrti koji paralelno može uključivati tri ključna načina programirane smrti stanica, prioptozu, apoptozu i nekroptozu.¹¹ Isto se tako smatra da ZDBD ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena s obzirom da vezanje ADAR-a na Z-DNA oko promotora reporterskoga gena rezultira povećanjem razina transkripcije. ADAR1-p150 sadržava dvije kopije Za i Zβ dok ADAR1-p110 sadržava samo Zβ. Inducirani ADAR1-p150 započinje na M1 zbog alternativnoga spajanja transkripta i nedostaju mu aminokiselinski ostatci 807-832 koje ADAR1-p110 sadržava zato što potiče na M296.



Slika 5 Organizacija domena unutar izoforma ADAR1 proteina.

Obje izoforme ADAR1 sadržavaju deaminaznu domenu (označeno zelenom bojom) koja se nalazi u C-terminalnoj regiji te tri domene vezanja dvolančane RNA (dsRNA) (označeno narančastom bojom) koje se nalaze u N-terminalnoj regiji. Razlika između izoforma ADAR1 nalazi se u N-terminalnoj D-DNA veznoj domeni gdje ADAR1 p110 izoforma ima samo Zβ Z-DNA veznu regiju, dok ADAR1 p150 izoforma ima i Za i Zβ Z-DNA vezne regije. (označeno plavom bojom). (Preuzeto i modificirano od Yang et al.⁷)

ADAR1 proteini prolaze brojne posttranslacijske procese, a jedan je od njih SUMOilacija. SUMOilacija je postupak kojim se SUMO proteini kovalentno vežu za specifične lizinske ostatke u ciljnim proteinima, što dovodi do regulacije različitih staničnih procesa kao što je apoptoza, regulacija staničnoga ciklusa, stabilnost proteina i regulacija transkripcije¹². ADAR1 se SUMOilira na lizinski ostatak 418 (K418), što prouzročuje smanjenu aktivnost uređivanja.

Mutacije lizina K554, K665 i K776 prisutnih u ADAR1 dovode do smanjene sposobnosti vezanja dsRNA u odgovarajućoj R domeni. Mutacija tirozina Y177, koja je odgovorna za funkciju Za domene p150, dovodi do smanjene sposobnosti vezanja DNA.

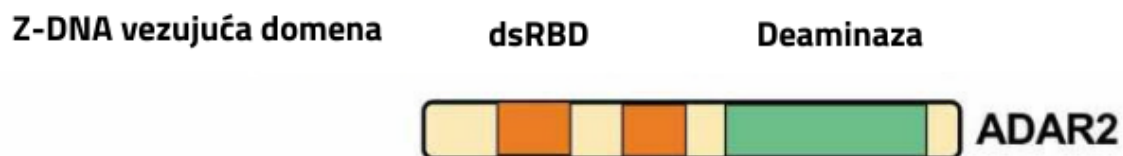
ADAR2

ADAR2 je bogato prisutan i lokaliziran u jezgrama stanica središnjega živčanog sustava (CNS). Za neke neurotransmitterske receptore, A→I uređivanje putem ADAR2 ključno je za transkripciju mRNA sekvencija i stvaranje različitih inačica proteina, što je bitno za normalan

razvoj i funkciju mozga. Osim toga, ADAR2 pruža dodatni sloj epigenetske regulacije biološke aktivnosti gena. Međutim, za razliku od ADAR1, uloge ADAR2 u A→I uređivanju nekodirajućih regija i prepoznavanju vlastite RNA još uvijek nisu potpuno utvrđene.¹³

U suprotnosti s ADAR1-p150, ekspresija proteina ADAR2 potaknuta je različitim konstitutivnim promotorima i uključuje alternativno spajanje transkripta. Kod miševa ablacija gena ADAR2 ne prouzročuje embrionalnu smrtnost, no istraživanja su potvrdila da miševi bez ADAR2 imaju povećanu smrtnost. Postnatalna smrt smanjena je umetanjem već reguliranoga Q/R mjesta receptora glutamata, što ukazuje na važnost ADAR2 za normalnu fiziologiju.¹⁰

ADAR2 se sastoji od dviju kopija dsRNA-vezujuće domene (RI i RII) u N-terminalnoj regiji, dok se katalitička deaminaza nalazi u C-terminalnoj regiji (Slika 6). Za razliku od ADAR1, ADAR2 ne posjeduje Z-DNA vezujuću domenu.



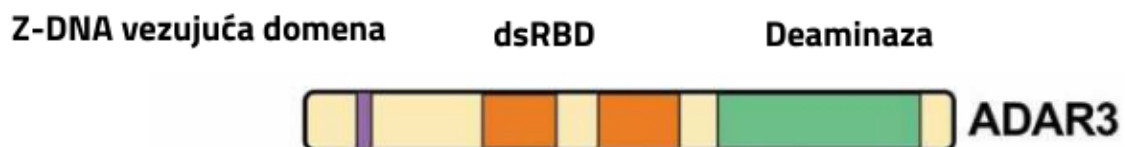
Slika 6 Organizacija domena unutar ADAR2 proteina. ADAR2 protein sadržava demainaznu domenu (označeno zelenom bojom) koja se nalazi u C-terminalnoj regiji te dvije domene vezanja dvolančane RNA (dsRBD) u N-terminalnoj regiji (označeno narančastom bojom). (Preuzeto i modificirano od Yang et al.⁷)

ADAR3

ADAR3 je prisutan u živčanome sustavu s najvišom ekspresijom u hipokampusu i amigdali. Iako se smatra da ima ulogu kao negativni regulator RNA uređivanja, također se vjeruje da može utjecati na

ekspresiju gena vezanjem na proteine. ADAR3 regulira uređivanje RNA na razini transkriptoma.¹⁴

ADAR3 sadržava dvije kopije dsRNA-vezujuće domene (RI i RII) u N-terminalnoj regiji, ali nema posjeduje enzimsku aktivnost deaminaze u C-terminalnoj regiji (Slika 7). Divlji tip (WT) ADAR3 ne pokazuje nikakvu katalitičku aktivnost deaminacije. Međutim, mutacija toga proteina kod ljudi na pet mjesta (A389V, V485I, E527Q, Q549R i Q733D) omogućuje aktivaciju enzimske funkcije.¹⁰ Još jedna od specifičnosti ADAR3 proteina u odnosu na ostale jest da se uz dsRNA može vezati i *in vitro* na jednolančanu RNA (ssRNA). Istraživanja su otkrila ssRNA vezne domene bogate ostatcima arginina u N-terminalnoj regiji. Međutim, za razliku od ADAR1 i ADAR2, ADAR3 nije sposoban katalizirati A→I uređivanje *in vitro*.



Slika 7 Organizacija domene unutar ADAR3 proteina. ADAR3 protein sadržava demainaznu domenu bez katalitičke aktivnosti (označeno zelenom bojom) koja se nalazi u C-terminalnoj regiji te dvije domene vezanja dvolančane RNA (dsRBD) u N-terminalnoj regiji (označeno narančastom bojom). Jedino se ADAR3 sastoji od argininom bogate jednolančane RNA vezne domene (označeno ljubičastom bojom). (Preuzeto i modificirano od Yang et al.⁷)

Studije na miševima s genetskom delecijom ADAR3 pokazale su da nedostatak ADAR3 ne prouzročuje embrijsku smrt. Međutim, miševi bez ADAR3 pokazuju nedostatke u oblikovanju pamćenja ovisnoga o hipokampusu, koji se odnosi na kratkotrajno i dugotrajno pamćenje, što ukazuje na njezinu važnost u mozgu.

Bolesti uzrokovane nedostatkom ADAR1 funkcija

ADAR enzim, zajedno s A→I uređivanjem, ima širok spektar bioloških funkcija. Neovisno o tome je li riječ o mutaciji ADAR1 gena, A→I uređivanju na specifične mete RNA ili izravnim interakcijama neovisnim o uređivanju s protein kinazom R (PKR) i DICER, ADAR1 je važan u drastičnim promjenama u ekspresiji RNA kao i u njezinoj funkciji.⁶

Studije su pokazale da uređivanje ADAR1 proteina štiti dsRNA od prepoznavanja molekularnih senzora urođene imunosti (PKR, RIG-I), čime se regulira urođeni imunitet i odgovor posredovan IFN-om. Upravo je nedostatak tih ADAR1 funkcija osnova patogeneze raznih autoinflamatornih bolesti, bolesti čiji je uzrok poremećaj prouzročen nedostatkom ili poremećajem regulacije nespecifične odnosno prirodene imunosti. Jedan je primjer takve bolesti Aicardi-Goutieres sindrom (AGS), rijetka i često fatalna autosomno recesivna genetska bolest čiji je uzrok mutacija u ADAR1. Ta bolest uglavnom utječe na mozak, imunološki sustav i kožu te je povezana s nekontroliranom proizvodnjom IFN tipa 1 (IFN1). Uređivanje A→I ključno je u suzbijanju IFN odgovora na endogeni RNA, te njegova disfunkcija može pridonijeti razvoju patološkoga stanja kao što je AGS. Uz AGS, ADAR1 utječe i na bilateralnu strijatalnu nekrozu, hereditarno spastičnu paraplegiju i mnoge druge bolesti koje uključuju regulaciju IFN-a.⁶ No, istraživanja su pokazala da doprinosi i razvoju autoimunih bolesti, kao što je reumatoidni artritis i sistemski eritemski lupus, u kojima uočene povišene razine ADAR1 proteina.

Kod nekoliko vrsta raka A→I uređivanje s pomoću ADAR1 potiče preživljavanje i proliferaciju raka ili je potrebno za to. Na primjer, uređivanje RNA inhibitora antizima1 (AZIN1) s pomoću ADAR1 dovodi do supstitucije Ser367Gly, što dovodi do povećanoga potencijala za razvoj raka. Takva je mutacija prvi put otkrivena u uzorcima hepatocelularnoga karcinoma (HCC), što je dovelo do agresivnijih tumorogenih svojstava. Kasnija istraživanja utvrdila su slične pojave i kod kolorektalnoga karcinoma (CGC). Isto tako, uređivanje nekodirajućih regija ili

nekodirajućih RNA (ncRNA) dovodi do razvoja tumora.¹⁵ ncRNA kao što je mikroRNA (miRNA) i duga nekodirajuća RNA (lncRNA) služe kao ključni regulatori puteva u raku. Prilikom RNA uređivanja tumor supresivne mikroRNA dolazi do narušavanja njezine biogeneze što utječe na kroničnu mijelogenu leukemiju. S druge strane, ADAR1 je također uključen i u uređivanje RNA kojemu je cilj suzbijanje proliferacije raka. Većina takvih modifikacija uključuje miRNA u različitim fazama sazrijevanja.

Mutacije u ADAR1 genima često imaju veze s regulacijom imunološkog odgovora što dovodi do povezanosti s infekcijama uzrokovanim virusima. ADAR proteini važni su i u regulaciji imunološkoga odgovora domaćina i kontroliranju replikacije virusa, pri čemu uređivanje može imati različite pro- ili antivirusne učinke te pridonijeti evoluciji virusa. Kakav učinak na virus će imati, ovisi o njegovoj specifičnosti i kombinaciji stanica domaćina. Primjer je jednog takvoga virusa virus ospica (engl. Measles virus, MV), u kojem inhibicija PKR-a uzrokuje provirusni učinak dok A→I uređivanje istodobno prouzročuje antivirusni učinak. Takve kontradikcije ukazuju na višestruku uključenost i važnost ADAR1 u raznim staničnim putovima.⁶ Također, održavanje stanične homeostaze ključna je funkcija toga sustava u ljudskome organizmu. Stoga, kako bi se osigurala normalna funkcija organizma i smanjio rizik od bolesti, važno je održavati uravnoteženu i preciznu regulaciju ADAR enzima i A→I uređivanja.

KSHV

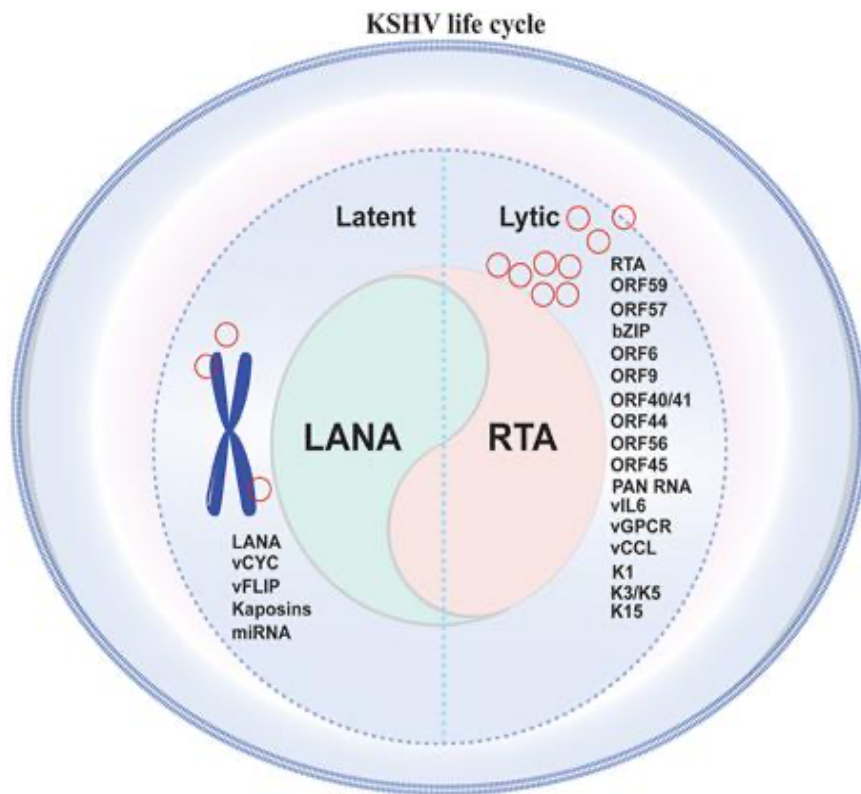
Kaposijev sarkom povezan s herpesvirusom (KSHV, engl. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*), poznat i kao humani herpesvirus 8 (HHV-8), virus je koji pripada potporodici gamaherpesvirusa. Poznato je da virusi uzrokuju približno 20 % svih ljudskih tumora te je i KSHV jedan od njih.¹⁶ Povezan je s trima vrstama malignih bolesti kod ljudi: Kaposijevim sarkomom (KS), odnosno multicentričnim krvožilnim tumorom¹⁷, primarnim efuzijskim limfomom (engl. *Primary Effusion Lymfoma*, PEL), koji se razvija unutar tjelesnih šupljina i multicentričnom Castlemanovom bolešću (engl. *Multicentric Castleman Disease*, MCD) odnosno nekontroliranim rastom limfoidnih stanica u više limfnih čvorova ili organa. Ti maligni poremećaji, povezani s infekcijom KSHV-om, ozbiljni su zdravstveni izazovi. Unatoč tomu što su KSHV i HIV, virus koji prouzročuje AIDS, različiti virusi, pacijenti s AIDS-om podložniji su infekciji KSHV-om, što dovodi do većega broja oboljelih od tih malignih bolesti. Nedavne studije pokazale su poveznicu KSHV-a s još nekoliko bolesti, kao što je KSHV upalni citokinski sindrom (KICS), koji karakteriziraju klasični simptomi KSHV-MCD bez patoloških dokaza o MCD-u kod pojedinaca s HIV-om, te upalni sindrom imunološke rekonstitucije (IRIS), koji ovisi o imunološkome odgovoru i povezan je s visokim morbiditetom.¹⁸ Takve bolesti dodatno naglašavaju njegovu ulogu u kompromitiranome imunološkom sustavu.

U većini slučajeva KSHV se prenosi slinom, ali moguća je zaraza i seksualnim kontaktom, transfuzijom krvi ili transplantacijom. Nakon ulaska u tijelo virus zahvaća različite stanice, posebno stanice koje oblažu krvne i limfne žile. Slično drugim herpesvirusima, infekcija ovim virusom doživotna je i trenutačno ne postoji lijek za nju. Liječenje je usmjereno na ublažavanje simptoma. Većina zaraženih osoba neće nikada pokazivati simptome, no ako imunološki sustav oslabi, postoji mogućnost ponovne aktivacije virusa s pojavom simptoma.¹⁹ Simptomi mogu uključivati lezije na koži, sluznici, u ustima, anusu, gastrointestinalnom sustavu te mogu utjecati na limfne čvorove.

Životni ciklus KSHV-a

KSHV je dvolančani DNA virus koji može zaraziti različite stanice, kao što su endotelne stanice, B-stanice i monociti. Tijekom svojega životnog ciklusa KSHV prolazi dvije glavne faze: latenciju i litičku reaktivaciju. Te faze omogućuju virusu da prelazi iz aktivne replikacije u mirnu infekciju. Nakon što zarazi stanicu, KSHV uspostavlja latenciju te se tada virus nalazi u obliku kružnoga episoma. Tijekom te faze ekspresija virusnih gena uvelike je ograničena.²⁰ Većina transkripata nalazi se u latencijskome lokusu i uključuje: ORFK12 (kaposini) (engl. *open reading frame*), ORF71 (vFLIP), ORF72 (vCyclin), ORF73 (LANA, latencijom povezan nuklearni antigen) i razne virusne mikroRNA (Slika 8).²¹ Oni podržavaju opstanak i širenje zaraženih stanica, dok istodobno ometaju imunološki odgovor domaćina i održavaju prisutnost virusne DNA. Tijekom latencije ključan je virusni protein LANA, koji je važan za održavanje latencije te na taj način pomaže u održavanju virusne DNA u zaraženim stanicama. Također, uključen je u replikaciji virusnih episoma i u regulaciji određenih virusnih i staničnih gena.²²

Nakon uspostave latencije povremene reaktivacije latentnoga virusa mogu dovesti do početka litičkoga ciklusa. Prelazak u litičku reaktivaciju prouzrokuje aktivaciju virusnih gena, virusna DNA umnožava se, formiraju se nove čestice, a zbog specifičnih fizioloških signala, dolazi do apoptoze zaraženih stanica. Prijelaz je iniciran proteinom ORF50 (protein aktivatora replikacije i transkripcije ili RTA) koji pokreće ekspresiju litičkih gena poznatih kao neposredno rani (engl. *Immediate early*, IE), rani (engl. *Early*, E) i kasni (engl. *Late*, L) geni. Oni omogućavaju replikaciju virusnoga genoma, što dovodi do proizvodnje virusa.²³ Litička replikacija olakšava ulazak virusa u stanice domaćina i između njih, no istodobno povećava rizik aktivacije imunološkoga sustava. Virusni proteini prisutni u svim fazama životnoga ciklusa KSHV-a imaju imunomodulirajuća svojstva kojima sprječavaju antivirusne odgovore domaćina.²⁴



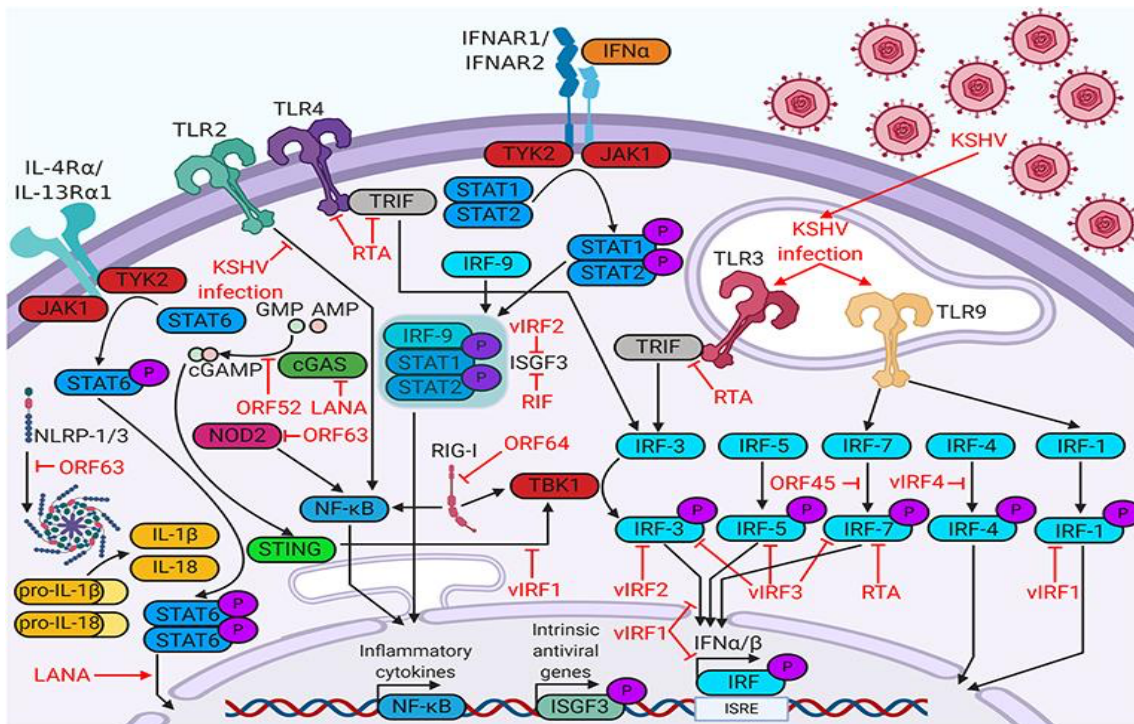
Slika 8 **Životni ciklus KSHV-a**. Životni ciklus sastoji se od dviju faza infekcije: latencije koju virus uspostavlja pri zarazi stanica te litičke faze. Održavanje ravnoteže između obiju faza ključno je u održavanju postojanosti virusa u domaćinu dok su genetski produkti iz obiju faza ključni u patogenezi bolesti povezane s KSHV-om. Uloga latencijom povezanoga nuklearnog antigena (LANA) (označeno zelenom bojom) jest održavanje latencija i vezanje epizomalnoga DNK virusa za kromatin domaćina. Pri latenciji ekspresija gena ograničena je, izraženi su samo LANA, vCYC, vFLIP, kaposini i nekoliko miRNA. Uloga aktivatora replikacije i transkripcije (RTA) (označeno ružičastom bojom) jest regulacija prelaska iz latencije u litičku fazu, pri čemu se aktivira više različitih virusnih gena (Preuzeto iz Purushothaman et al.²⁵)

Razvoj infekcije

KSHV je razvio mehanizme kojim izbjegava imunološki odgovor domaćina, potiče proliferaciju zaraženih stanica i sprječava njihovu apoptozu (Slika 9). Time omogućuje virusu da uspostavi uspješnu infekciju koja traje cijeli život. Te su strategije češće prisutne tijekom latentne faze infekcije s obzirom na to da je imunološki odgovor domaćina obično snažniji tijekom litičke faze. Osim toga, KSHV ima višestruki utjecaj na staničnu signalizaciju, pri čemu pojedini gen može utjecati na formiranje različitih svojstava, što pridonosi razvoju karcinoma i procesu angiogeneze.

Jedan je od primjera KSHV proteina koji je povezan s KS-om, KSHV-MCD-om i PEL-om je vFLIP. vFLIP povećava aktivaciju nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B), koji je ključni regulatorni faktor u imunološkom odgovoru i upalnim procesima te regulira ekspresiju gena uključenih u imunološki odgovor. KSHV također utječe na puteve AKT i mTOR, koji potiču preživljavanje i rast stanica te su često povišeni u mnogim vrstama raka. Zanimljivo je da se sirolimusom, inhibitorom mTOR signalnoga puta, može koristiti za liječenje KS-a kod transplantacijskih pacijenata. PEL stanične linije moraju izražavati latentne virusne proteine kako bi preživjele, a suzbijanje određenih latentnih gena KSHV-a može dovesti do apoptoze stanica.²⁶

KSHV kodira brojne proteine i male RNA molekule za koje se vjeruje da neizravno transformiraju stanice domaćina dok obavljaju svoju ulogu pomaganja virusu da preživi u zaraženome organizmu. U lezijama KS-a, većina tumorskih stanica pokazuje latentnu infekciju, što znači da virus ne izaziva izražavanje svojih gena. Međutim, pri zarazi KSHV-om vidljivo je aktivno umnažanje i izražavanje gena virusa u tumorima. Približno 1% zaraženih stanica u KS-u izražava litičke gene virusa. Postotak stanica raste u PEL-u dok je on u MCD-u najviši.²⁶



Slika 9 Proteini KSHV-a omogućuju izbjegavanje urođenoga imuniteta. Djeluju protiv virusnih senzora i interferonskih odgovora, ciljajući na različite imunološke čimbenike domaćina, što dovodi do smanjenja imunološkoga odgovora na infekciju. (Preuzeto iz Broussard et al.²⁴)

Urođeni imunološki odgovor

Infekcija KSHV-om pokreće urođeni imunološki odgovor aktivirajući nekoliko RNA i DNA senzora domaćina. Stanice otkrivaju viruse tako što se vežu za molekularni uzorak povezan s patogenom (PAMP, engl. *pathogen associated molecular patterns*) na receptore za prepoznavanje uzoraka (PRR, engl. *pattern recognition receptor*). Aktivacija PRR inhibira signalne puteve koji potiču transkripciju antivirusnih gena, proizvodnju IFN-a ili apoptozu. Neki su od infekcijom aktiviranih DNA i RNA senzora receptori slični Toll-u (TLR), receptore slične proteinu i proteina inducibilnoga retinoičnom kiselinom (RIG-I), receptori slični oligomerizacijskoj domeni vezanja nukleotida (NOD) (NLR) i putevima stimulatora cikličke GMP-AMP sintaze (cGAS) proteina gena interferona (STING).

Postoji 10 vrsta TLR, od kojih se šest nalazi na membrani plazme dok su ostalih četiri eksprimirani u unutarstaničnim vezikulama.²⁴ TLR u različitim dijelovima stanice prepoznaju različite PAMP-ove. Membranski TLR prepoznaju strukturne komponente invazivnih patogena, kao što su virusni glikoproteini, dok vezikularni TLR prepoznaju patogenu DNA ili RNA. U monocitima KSHV infekcija prouzročuje stimulaciju TLR3, RNA senzora, dok istodobno aktivira TLR9, DNA senzor, u plazmocitoidnim dendritskim stanicama (pDC). Aktivacija tih TLR-a potiče proizvodnju IFN- α te regulira antivirusne citokine. RTA regulira TLR signalizaciju tako što prouzročuje degradaciju TLR3 adaptorskoga proteina TRIF i TLR4 proteina primarnoga odgovora mijeloidne diferencijacije mRNA koji kodira adaptorski protein 88 (MyD88, engl. *Myeloid differentiation primary response 88*), čime blokira signalizaciju. KSHV-kodirani G protein-spregnuti receptor (vGPCR), kodiran od ORF74, kao i vIRF1, prouzročuju smanjenje signalizacije TLR4.

Receptori RIG-I kao odgovor na dsRNA pojačavaju IFN1 te sudjeluju u otkrivanju DNA virusa. Virusna deubikvitinaza ORF64 suprimira RIG-I sprječavajući njegovu ubikvitinaciju i aktivaciju. NLR stvaraju inflamosome čija je uloga proizvodnja upalnih citokina i poticanje apoptotičke kaspaze. KSHV ORF63 veže nekoliko članova obitelji NLR, kao što je NLRP1, čime smanjuje infekciju i proizvodnju upalnih citokina. KSHV cilja cGAS-STING put na više točaka. KSHV ORF52 veže se i inhibira enzimsku aktivnost cGAS-a tako što blokira proizvodnju cGAMP-a. LANA se veže za cGAS te blokira aktivaciju TANK vežuće kinaze 1 (TBK1), proteina koji inducira interferone te na taj način blokira odgovor IFN- α . vIRF1 se veže izravno na STING i blokira regrutiranje TBK1 .

Kao rezultat aktivacije svih tih signalnih putova dolazi do stimulacije IFN1 i protuupalnih citokina čija je uloga uspostaviti antivirusno stanje i spriječiti infekciju i replikaciju KSHV-a. Iako je KSHV DNA virus, njegova infekcija aktivira signalni put receptora sličnih RIG-u (RLR) te dolazi do

proizvodnje RNA iz virusa i domaćina koji su prepoznati od MDA5 (gen 5 povezan s diferencijacijom melanoma) i RIG-I.

RIG-I i MDA5 dva su glavna dsRNA senzora čija je uloga da zajedno s mitohondrijskim antivirusnim signalizacijskim adapterskim proteinom (MAVS, engl. *mitochondrial antiviral-signalling protein*) pokreću signalizaciju i proizvodnju IFN tipa I. Za povećanje učinkovitosti svoje infekcije KSHV kodira virusne deubikvitinaze. Ta deubikvitinaza ima sposobnost uklanjanja ubikvitinskih markera s RIG-I, čime sprječava RIG-I IFN-posredovanu indukciju koja je uobičajeni imunološki odgovor protiv virusne infekcije.

IZBJEGAVANJE IMUNOLOŠKOGA ODGOVORA S POMOĆU ADAR PROTEINA

U prirodi, dsRNA je povezana s većinom virusnih infekcija. Generira se kao odgovor na infekciju patogenima kao što virusi. U stanicama domaćina postoje endogene RNA molekule koje imaju sposobnost formiranja dvostruke strukture. Prisutnost dsRNA u stanicama može biti prepoznata kao znak infekcije virusom ili nekim drugim patogenom čime se aktivira upalni odgovor protiv infekcije. Međutim, stalno prepoznavanje tih struktura dovodi do prekomjernog i nepotrebnog upalnog odgovora koji može biti štetan za domaćina. Kako bi se to izbjeglo, stanice domaćina trebale su razviti učinkovitu obranu. Jedan od mehanizama koji sprječava detekciju endogenih dsRNA molekula od PRR jest modifikacija RNA odnosno A→I uređivanje posredovano ADAR1 proteinom. ADAR1 enzim može prepoznati endogenu strukturu dsRNA i preinačiti ih tako da mijenja specifični nukleotid.

Tijekom litičke reaktivacije KSHV-a, inhibicija proteina ADAR1 dovodi do povećane proizvodnje IFN-I. Za učinkovit antivirusni odgovor IFN tip I se veže na interferon- α/β receptor (IFNAR) i potiče aktivaciju IFN-stimuliranih gena (ISG).²⁰ Aktivacija ISG-a i protuupalnih citokina dovodi do ometanja transkripcije virusnih gena KSHV-a i smanjenom proizvodnjom novih virusnih čestica (viriona). Suzbijanje proteina ADAR1 dovodi do povećane proizvodnje IFN tipa I tijekom litičke reaktivacije KSHV-a. Dodatno, smanjena ekspresija ADAR1 proteina dovodi do značajnog smanjenja ekspresije određenih gena KSHV-a induciranih tijekom litičke reaktivacije. To uključuje gene poput virusnog interleukina-6 (vIL-6) (latentni i litički gen), ORF39 (rani gen) i K8.1 (kasni gen). Smanjena ekspresija tih gena doprinosi smanjenju virusne replikacije i proizvodnje viriona.

Tijekom litičke reaktivacije KSHV-a ADAR1 ima provirusni učinak i važan je za optimalnu litičku reaktivaciju KSHV-a iz latentne faze. Iako i

ADAR1 i ADAR2 imaju sposobnost uređivanja RNA A→I, utjecaj ADAR2 izrazito je manji u usporedbi s ADAR1. Također, obje izoforme ADAR1, p110 i p150, doprinose sprječavanju urođene imunološke aktivacije tijekom litičke reaktivacije KSHV-a.

Uređivanje ORF K12

Od više od 80 virusnih ORF koji se nalaze u KSHV-u tijekom latentne faze virusne replikacije, ekspresija RNA i proteina ograničena je na mali dio njih. Jedni su od četiriju KSHV proteina koji su izraženi u svim latentno zaraženim stanicama su kaposini (ORF K12) čija je regija transkripcije i translacije jedinstvena za HHV-8. Transkript može proizvesti tri proteina; kaposin A, kaposin B i kaposin C. Studije su pokazale da kaposini imaju onkogeni učinak te mogu utjecati na signalne puteve u stanici što rezultira proliferacijom i smanjenjem apoptoze. Isto tako mogu mijenjati interakciju KSHV i domaćina tako što mijenjaju imunološki odgovor domaćina i omogućiti virusu da izbjegava prepoznavanje i uništavanje od strane imunološkog sustava. To može rezultirati kroničnim infekcijama KSHV-a što povećava rizik od razvoja raka. Unutar kaposina postoji specifična regija koja kodira miRNA. Jedina miRNA procesuirana iz tih kodirajućih regija jest miR-K10.²⁷

U području genoma 117990, prisutna je heterogenost, odnosno prisutnost različitih nukleotidnih sekvencija, koja je prouzročena RNA uređivanjem K12 RNA kataliziranog proteinom ADAR1.²⁸ Funkcija proteina ili razina ekspresije mijenjaju se uređivanjem. Na primjeru transkripta K12, uređivanje prouzročuje promjenu serina u glicin dok u miRNA-K10 na položaju 2 blizu 5' kraja mijenja specifične mRNA koje su potencijalne mete za tu miRNA što dovodi do eliminacije tumorogene aktivnosti. Studija provedena kvantitativnom RT-PCR analizom RNA izvedene iz PEL staničnih linija, BC3 i BCBL1, ukazuje na to da dominantnu ulogu u uređivanju ima ADAR1 protein. Ovo je podržano činjenicom da je mRNA za ADAR1 10 do 20 puta obilniji od onog za ADAR2. Ovi rezultati su u

skladu s obzirom na to da je ekspresija ADAR2 većinom unutar mozga, a ADAR1 je izražen u većini stanica i tkiva.

Razina uređivanja regulirana je stanjem replikacije virusa, posebno u kontekstu gamaherpesvirusa. Kako bi održali aktivnu populaciju stanica zaraženih virusom, tijekom latencije gamaherpesvirusi proizvode transkripte s tumorogenom aktivnošću. U tom razdoblju, transkript kaposina koji prolazi kroz latentnu fazu pokazuje tumorogenu aktivnost i nije podvrgnut uređivanju. Međutim, pri prelasku u litičku reaktivaciju, primjećuje se znatan porast uređenih transkriptata.

Udio uređenih transkriptata tijekom KSHV infekcije povećava se sa 8% na 65% pokazujući minimalnu ili nikakvu tumorogenu aktivnost.²⁸ Prisutnost G (I) na 117990 koja je posljedica uređivanja A→I povezana je s litičkom replikacijom KSHV-a. Iako nije jasno zbog čega se pojavljuju razlike u funkciji i koji je uzrok velikog porasta uređenih transkriptata, smatra se da je to posljedica uređivanja RNA. Jedna je teorija da citokini proizvedeni tijekom litičke replikacije infekcije potiču ekspresiju ADAR1, što prouzročuje povećanje uređivanja. Drugi je prijedlog da se uređivanje uspješnije odvija na litičkim K12 transkriptima koji nisu spojeni nego na latentnim transkriptima koji su spojeni.

U svakom slučaju, prisutnost uređivanja RNA tijekom litičke replikacije KSHV-a povezana je s promjenama u funkciji transkriptata i smanjenjem tumorogene aktivnosti no detaljni mehanizmi i regulacija ovih procesa još uvijek su predmet istraživanja.

Uloga ADAR1 u RLR signalnome putu

Receptori slični RIG-I (RLR, engl. Retinoic acid-inducible gene I-like receptors) skupina je RNA receptora lociranih u citosolu koji imaju ključnu ulogu u detekciji patogena RNA virusne infekcije. Oni imaju sposobnost otkrivanja virusnih RNA liganada ili prerađivanja vlastite RNA, što doprinosi aktivaciji urođenog imuniteta, upale i pokretanja ekspresije gena koji služe za kontrolu infekcije. Postoje tri člana RLR-a: do danas

najbolje opisan RLR receptor, RIG-I (gen I inducibilan retinoičnom kiselinom) te MDA5 (faktor 5 povezan s diferencijacijom melanoma) i LGP2 (laboratorij za genetiku i fiziologiju 2 i homolog mišjega D11lgp2).²⁹ RIG-I i MDA5 IFN-inducibilni su geni. Tijekom litičke reaktivacije KSHV-a, dolazi do indukcije dsRNA, a s obzirom na to da je reaktivacija povezana s indukcijom IFN β te da smanjenje razine ADAR1 proteina dodatno pojačava tu indukciju, postavlja se pitanje je li taj proces ovisan o aktivaciji RLR signalnoga puta.

Kad MDA5 i RIG-I detektiraju prisutnost virusne RNA, aktivira se mitohondrijski antivirusni signalni protein (MAVS). MAVS formira kompleks s drugim proteinskim molekulama čime se inicira niz signalnih događaja nizvodno.²⁰ Ti putevi aktiviraju faktore poput TANK-vezujuće kinaze 1 (TBK1) i inhibitora nuklearnog faktora κ -B kinase ϵ (IKK ϵ). TBK1 i IKK ϵ fosforiliraju transkripcijske faktore poput interferenskog regulatornog faktora 3 (IRF3) i interferenskog regulatornog faktora 7 (IRF7) koji kodiraju IFN i druge antivirusne ili imunoregulacijske proteine. MAVS također aktivira i NF- κ B, koji zajedno s IRF3 i IRF7 zatim potiču transkripciju gena koji kodiraju IFN i druge antivirusne ili imunoregulacijske proteine.

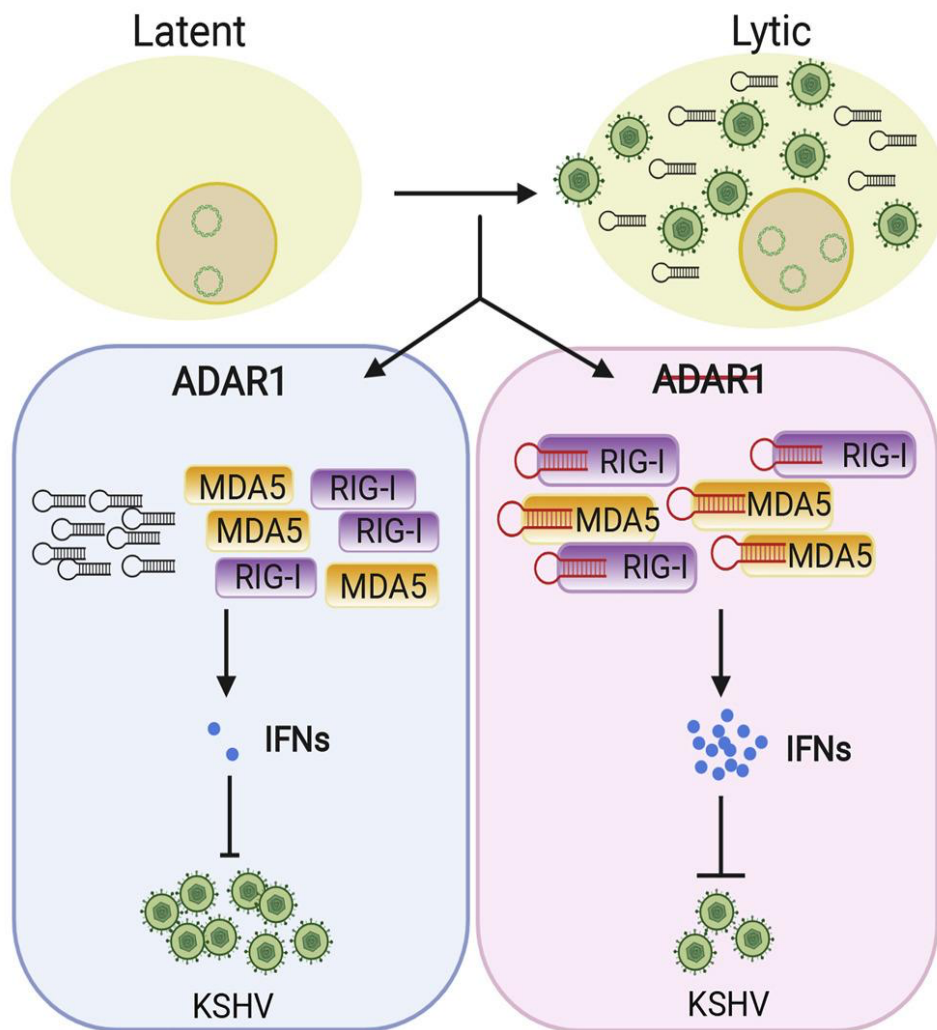
U kontroliranim stanicama reaktivacija KSHV-a dovodi do fosforilacije TBK1 i IRF3. Međutim, kada dođe do smanjenja razine ADAR1 proteina, opaža se znatno smanjenje fosforilacije obaju proteina, posebno 72 sata nakon reaktivacije.²⁰ To sugerira da ADAR1 ima regulatornu ulogu u modulaciji fosforilacijskoga statusa TBK1 i IRF3 tijekom reaktivacije KSHV-a.

Tijekom litičke reaktivacije KSHV-a nedostatak ADAR1 dovodi do povećane proizvodnje IFN-a u kombinaciji s MDA5 i RIG-I receptorima. Kad tijekom reaktivacije KSHV-a MDA5 ili RIG-I receptori nedostaju u stanicama bez ADAR1, potpuno se sprječava fosforilacija TBK1 i IRF3. Smanjenje razine ADAR1 zajedno s MDA5 receptorom spašava transkripciju virusnih gena, dok smanjenje razine ADAR1 zajedno s RIG-I receptorom djelomično poboljšava situaciju. Ovi rezultati ukazuju na

važnost aktivacije RLR signalnoga puta za pojačane urođene imunološke odgovore tijekom reaktivacije KSHV-a u stanicama bez ADAR1 (Slika 10).

Aktivacija MAVS-a i nizvodnih signalnih puteva strogo je regulirana kako bi se spriječila prekomjerna imunološka aktivacija i održala imunološka ravnoteža. Međutim, ako nedostaje i ADAR1 i MAVS, indukcija mRNA interferona potpuno je inhibirana, a transkripcija virusnih gena omogućena je.²⁰ Drugim riječima, kad je i ADAR1 i MAVS odsutan, dolazi do replikacije virusnih gena bez indukcije interferona.

Aktivacija RLR puta potiče se određenim staničnim RNA molekulama poput GINS1 i NOP14, koje djeluju kao ligandi za RIG-I i MDA5 receptore. Te RNA molekule sadržavaju adenzinske pozicije koje su podložne uređivanju s pomoću ADAR1 enzima. U stanicama s niskom razinom ADAR1, neuređene RNA molekule mogu biti osjetljive na prepoznavanje putem drugih mehanizama kao što je vezanje J2 antitijelima koja se selektivno vežu na dsRNA. Iako J2 antitijelo ima drukčiji mehanizam prepoznavanja u usporedbi s MDA5 i RIG-I receptorima, pretpostavlja se da neuređene stanične RNA molekule mogu biti osjetljivije na prepoznavanje od MDA5 ili RIG-I receptora u odsustvu ADAR1, što dovodi do aktivacije RLR puta.



Slika 10 **Supresija ADAR1 inhibira prelazak iz latentne u litičku fazu KSHV-a.** Nedostatak ADAR1 dovodi do povećane proizvodnje IFN-akoji aktiviraju ekspresiju ISG-ova i proupalnih citokina čime se smanjuje KSHV infekcija (Preuzeto od Zhang et al.²⁰).

Primarni efuzijski limfom

Primarni efuzijski limfom (PEL, engl. *primary effusion lymphoma*) rijedak je i brzo napredujući ne-Hodgkinov limfom B-stanica koji je povezan s prisutnošću HHV-8. Taj oblik limfoma razvija se u tjelesnim šupljinama, najčešće u peritoneumu, pleuralnome prostoru i perikardu, gdje se pojavljuju izljevi tekućine bez vidljivih tumorskih masa.³⁰ PEL obično zahvaća jednu tjelesnu šupljinu i ograničava se na nju. Međutim, u nekim slučajevima pacijenti mogu razviti tumore i izvan šupljina, poput

gastrointestinalnoga trakta, kože, pluća, središnjega živčanog sustava i limfnih čvorova. Prognoza je oboljelih općenito loša, čak i uz primjenu antiretrovirusnih terapija (ART) i razvoj molekularno ciljanih terapija usmjerenih na suzbijanje proliferacije tumora i preživljavanja stanica.³¹

Hidrolitička deaminacija koja potiče pretvorbu adenzina u inozin dovodi do promjena u komplementarnim DNA (cDNA) sekvencijama u PEL stanicama.² Analize su pokazale da se većina uređenih mjesta (oko 70 %) nalazi unutar gena koji kodiraju proteine. Unutar tih gena, 60% uređenih mjesta lokalizirano je u intronskim regijama, dok se približno 30 % uređenih mjesta nalazi u neprevedenim regijama (UTR). To ukazuje na to da važnost uređivanja u regulaciji procesa kao što su obrada pre-mRNA, alternativni splicing, stabilnost mRNA i translacijska kontrola. Također, više od 50% uređenih mjesta u međugenskome prostoru mapira se na transkripte koji ne kodiraju proteine. To ukazuje na to da uređivanje može regulirati odgovor domaćina na KSHV i tijekom i nakon transkripcije.

Uređivanje A→I važna je modifikaciju RNA, a istraživanja su pokazala da se najveći dio A→I uređivanja događa unutar transkribiranih Alu sekvencij u ljudskome genomu.³² Alu elementi su kratke repetitivne sekvence DNA koje su prisutne u višekopiji u genomu. Sukladno tomu, analize u kontekstu PEL-a pokazuju da više od 90% uređenih mjesta pripada repetitivnim elementima, posebno unutar Alu sekvencija. Uređivanje unutar Alu sekvencija mogu imati važan utjecaj na genomsku stabilnost, regulaciju transkripcije i funkciju genoma što pomaže u razumijevanju bolesti.

Tijekom prelaska iz latentne u litičku fazu dolazi do povećanja A→I uređivanja. Smatra se da je to posljedica povećane prisutnosti dsRNA tijekom litičke reaktivacije, pri čemu neki od tih dsRNA molekula utječu na proces uređivanja.² Uređivanje A→I tijekom litičke reaktivacije KSHV-a ima potencijal deregulacije ključnih putova u latenciji i tumorogenezi. To sugerira da promjene u uređivanju mogu utjecati na funkciju i ekspresiju gena i u domaćinu i u virusu.

Uređivanje KSHV miRNA

miRNA su male nekodirajuće RNA molekule koje se nalaze u kralježnjacima, beskralježnjacima i biljkama. Osim što ih proizvodi većina biljaka i životinja, određeni virusi također mogu proizvesti vlastite miRNA molekule. Virusne miRNA pomažu virusima izbjeći imunološki odgovor domaćina, regulirati ekspresiju gena domaćina i virusa, stvoriti okruženje pogodno za replikaciju virusa te utjecati na latenciju virusa.³³

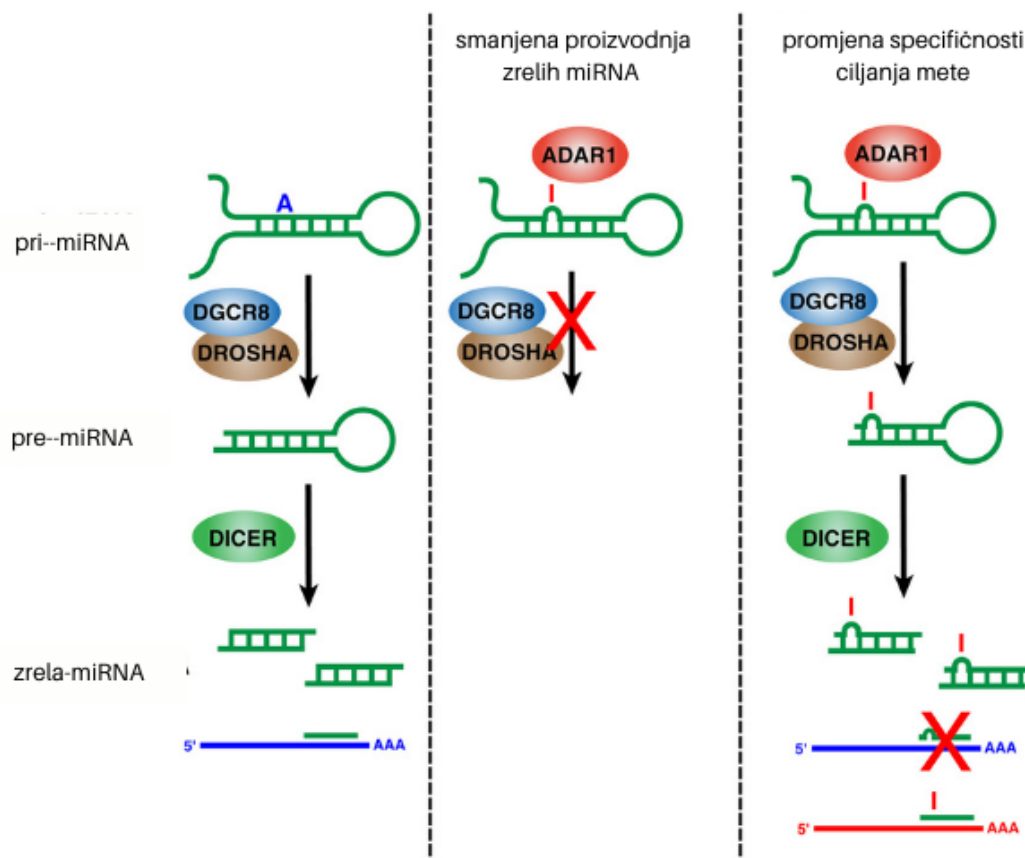
KSHV kodira 12 virusnih pre-miRNA koje se transformiraju u 25 funkcionalnih miRNA molekula. Virusne miRNA utječu na stanične procese poput zaustavljanja staničnoga ciklusa, preživljavanja stanica i transformacije. Oni su povezani s regulacijom aerobne glikolize, koja je važna za brzi rast različitih vrsta raka, kao i oksidativne fosforilacije pod stresom. miRNA su ključne za regulaciju virusnih gena tijekom cijeloga životnog ciklusa virusa te zbog svojih funkcija izravno ciljaju ključne virusne gene i sudjeluju u onkogenezi, što doprinosi razvoju KS-a i drugih malignih bolesti povezanih s KSHV-om.³⁴ Razumijevanje uloge virusnih miRNA pomaže u boljem razumijevanju patogeneze bolesti prouzročenih KSHV-om te može dovesti do razvoja novih terapijskih strategija za suzbijanje tih malignih bolesti.³⁵

Najčešći je način komplementarnoga povezivanja miRNA s ciljnim mRNA je putem regije klice (engl. *seed sequence*), koja se nalazi na 5' kraju miRNA. Istraživanja su otkrila tri mjesta uređivanja katalizirana ADAR1 proteinom na pri-miRNA-K12-4 transkriptu.² Dva od tih mjesta uređivanja nalaze se unutar donje regije miRNA sekvencije na pri-miRNA-K12-4, dok je treće mjesto uređivanja smješteno unutar regije klice zrele miRNA-K12-4-3p.

Heterotrimerni mikroprocesor je proteinski kompleks ključan u biogenezi miRNA. Sastoji se od dvaju DGCR8 proteina i jednog DROSHA proteina. DROSHA djeluje kao „ravvalo“ koje razdvaja primarne transkripte miRNA na specifičnom mjestu udaljenom 11 nukleotida od

baznoga spoja dok dva DGCR8 proteina vežu gornju stabljiku kako bi povećali učinkovitost i preciznost DROSHA cijepanja.

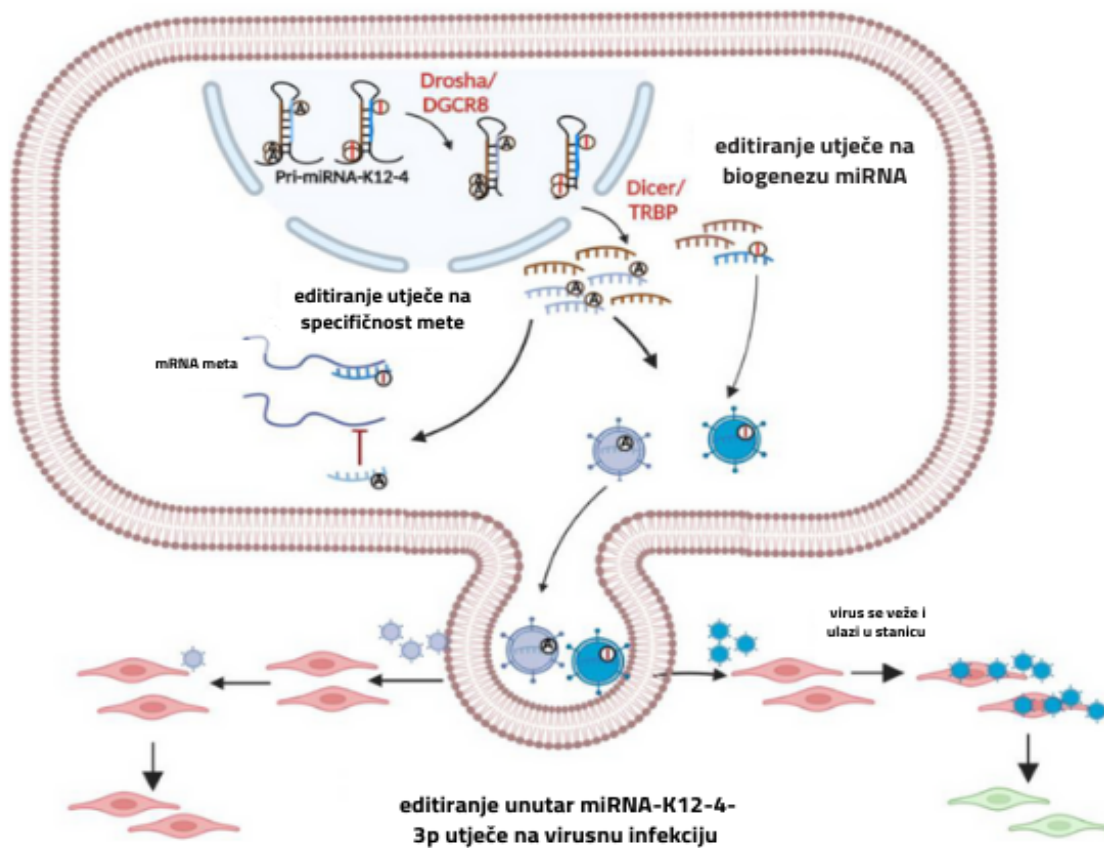
U slučaju pri-miRNA-K12-4, primarnog transkripta koji kodira miRNA-K12, mjesta uređivanja nalaze se u donjoj regiji klice miRNA 3 nukleotida uzvodno od mjesta cijepanja DROSHA. Analize su pokazale da uređivanje utječe na proces sazrijevanja miRNA tako što inhibira rezanje pomoću DROSHA i DGCR8 proteina što rezultira smanjenim razinom specifične zrele miRNA-K12-4-3p molekule (Slika 11). Važno je napomenuti da prisutnost Epstein-Barr virusa (EBV) nema utjecaja na uređivanje pri-miRNA-K12-4 ovisno o ADAR1.³⁶ To ukazuje na to da mehanizmi uređivanja miRNA mogu biti specifični za određene viruse.



Slika 11 ADAR1 utječe na sazrijevanje miRNA. Proces zrenja miRNA kreće iz primarnog transkripta miRNA (pri-miRNA) koji prolazi kroz proces obrade u prekursor miRNA (pre-miRNA) pomoću mikroprocesorskog kompleksa sastavljenog od DGCR8 i DROSHA. Pre-miRNA se zatim reže

pomoću enzima DICER kako bi se generirala zrela miRNA (Proces označen u prvom stupcu). Proces uređivanje inhibira rezanje pri-miRNA ili pre-miRNA s pomoću DROSHA i DGCR8 što uzrokuje smanjenu proizvodnju zrelih miRNA (Proces prikazan u drugom stupcu). Proces uređivanja može se odvijati u miRNA regiji klice što rezultira promjenom specifičnosti ciljanja mete (Proces prikazan u trećem stupcu). (Preuzeto i modificirano Song et al. ⁶)

Specifičnost miRNA u ciljanju određene RNA određena je sekvencijom regije klice. A→I uređivanje miRNA unutar regije klice utječe na specifičnost ciljanja tako što učinkovito proširuje ciljane RNA s kojima se može miRNA upariti. Kada je miRNA-K12-4-3p uređena, ciljane RNA molekule obogaćene su genima koji su povezani s rastom i razvojem stanice te regulacijom transkripta domaćina. S druge strane, ako ne dođe do uređivanja, ciljane RNA molekule su obogaćene genima koji su uključeni u transkripcijske procese, metaboličke procese i biosintezu makromolekula (Slika 12). Ova promjena u ciljanju gena putem uređivanja miRNA može imati značajan utjecaj na funkciju stanica i regulaciju genske ekspresije. Uređivanje miR-K12-4-3p također ima velik utjecaj na biogenezu, što je neophodno za proizvodnju novih virusnih čestica tijekom infekcije KSHV-om. Drugim riječima, A→I uređivanje doprinosi učinkovitoj infekciji KSHV.



Slika 12 Uređivanje kod pri-miRNA-K12-4-3p i miRNA-K12-4-3p. Uređivanje kod pri- miRNA-K12-4-3p rezultira smanjenom proizvodnjom zrelih miRNA. Uređivanje kod miRNA-K12-4-3p utječe na specifičnost ciljanja mete RNA kao i obnavljanje virusne infekcije (Preuzeto i modificirano od: Rajenden et al. ²)

POPIS LITERATURE

1. Whitley Richard J. Herpesviruses. in *Medical Microbiology*. 4th edition.
2. Rajendren, S., Ye, X., Dunker, W., Richardson, A. & Karijolich, J. The cellular and KSHV A-to-I RNA editome in primary effusion lymphoma and its role in the viral lifecycle. *Nat Commun* **14**, 1367 (2023).
3. Tomaselli Sara, Galeano Federica, Locatelli Franco & Gallo Angela. ADARs and the Balance Game between Virus Infection and Innate Immune Cell Response. *Curr Issues Mol Biol* (2015) doi:10.21775/cimb.017.037.
4. Gélinas, J.-F., Clerzius, G., Shaw, E. & Gatignol, A. Enhancement of Replication of RNA Viruses by ADAR1 via RNA Editing and Inhibition of RNA-Activated Protein Kinase. *J Virol* **85**, 8460–8466 (2011).
5. Martin Jeffrey N. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. (Cambridge University Press, 2007).
6. Song, B., Shiromoto, Y., Minakuchi, M. & Nishikura, K. The role of RNA editing enzyme ADAR1 in human disease. *WIREs RNA* **13**, (2022).
7. Yang, Y., Okada, S. & Sakurai, M. Adenosine-to-inosine RNA editing in neurological development and disease. *RNA Biol* **18**, 999–1013 (2021).
8. Kallman, A. M. ADAR2 A-->I editing: site selectivity and editing efficiency are separate events. *Nucleic Acids Res* **31**, 4874–4881 (2003).
9. Samuel, C. E. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral. *Virology* **411**, 180–193 (2011).
10. Pfaller, C. K., George, C. X. & Samuel, C. E. Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs) and Viral Infections. *Annu Rev Virol* **8**, 239–264 (2021).
11. Kuriakose, T. *et al.* ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways. *Sci Immunol* **1**, (2016).
12. Maejima, Y. & Sadoshima, J. SUMOylation. *Circ Res* **115**, 686–689 (2014).
13. Yanai, M. *et al.* ADAR2 Is Involved in Self and Nonself Recognition of Borna Disease Virus Genomic RNA in the Nucleus. *J Virol* **94**, (2020).
14. Raghava Kurup, R. *et al.* RNA binding by ADAR3 inhibits adenosine-to-inosine editing and promotes expression of immune response protein MAVS. *Journal of Biological Chemistry* **298**, 102267 (2022).
15. Wang, H., Chen, S., Wei, J., Song, G. & Zhao, Y. A-to-I RNA Editing in Cancer: From Evaluating the Editing Level to Exploring the Editing Effects. *Front Oncol* **10**, (2021).
16. McLaughlin-Drubin, M. E. & Munger, K. Viruses associated with human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1782**, 127–150 (2008).

17. Kaposijev sarkom. *MSD priručnik dijagnostike i terapije*
<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/dermatologija/rak-koze/kaposijev-sarkom>.
18. De Paoli, P. & Carbone, A. Kaposi's Sarcoma Herpesvirus: twenty years after its discovery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **20**, 1288–94 (2016).
19. KSHV. *The Chang-Moore Lab Cancer Virology Program* (2023).
20. Zhang, H., Ni, G. & Damania, B. ADAR1 Facilitates KSHV Lytic Reactivation by Modulating the RLR-Dependent Signaling Pathway. *Cell Rep* **31**, 107564 (2020).
21. Goncalves, P. H., Ziegelbauer, J., Uldrick, T. S. & Yarchoan, R. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. *Curr Opin HIV AIDS* **12**, 47–56 (2017).
22. Uppal, T., Banerjee, S., Sun, Z., Verma, S. & Robertson, E. KSHV LANA—The Master Regulator of KSHV Latency. *Viruses* **6**, 4961–4998 (2014).
23. Combs, L. R., Spires, L. M., Alonso, J. D., Papp, B. & Toth, Z. KSHV RTA Induces Degradation of the Host Transcription Repressor ID2 To Promote the Viral Lytic Cycle. *J Virol* **96**, (2022).
24. Broussard, G. & Damania, B. KSHV: Immune Modulation and Immunotherapy. *Front Immunol* **10**, (2020).
25. Purushothaman, P., Dabral, P., Gupta, N., Sarkar, R. & Verma, S. C. KSHV Genome Replication and Maintenance. *Front Microbiol* **7**, (2016).
26. Goncalves, P. H., Ziegelbauer, J., Uldrick, T. S. & Yarchoan, R. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. *Curr Opin HIV AIDS* **12**, 47–56 (2017).
27. Forte, E. *et al.* MicroRNA-Mediated Transformation by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Kaposin Locus. *J Virol* **89**, 2333–2341 (2015).
28. Gandy, S. Z. *et al.* RNA Editing of the Human Herpesvirus 8 Kaposin Transcript Eliminates Its Transforming Activity and Is Induced during Lytic Replication. *J Virol* **81**, 13544–13551 (2007).
29. Loo, Y.-M. & Gale, M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
30. Calabrò, M. L. & Sarid, R. HUMAN HERPESVIRUS 8 AND LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **10**, e2018061 (2018).
31. Shimada, K., Hayakawa, F. & Kiyoi, H. Biology and management of primary effusion lymphoma. *Blood* **132**, 1879–1888 (2018).
32. Kim, D. D. Y. *et al.* Widespread RNA Editing of Embedded *Alu* Elements in the Human Transcriptome. *Genome Res* **14**, 1719–1725 (2004).
33. Islam, M. S. & Islam, A. B. M. M. K. Viral miRNAs confer survival in host cells by targeting apoptosis related host genes. *Inform Med Unlocked* **22**, 100501 (2021).

34. Vojtechova, Z. & Tachezy, R. The Role of miRNAs in Virus-Mediated Oncogenesis. *Int J Mol Sci* **19**, 1217 (2018).
35. Zhu, Y. *et al.* An Oncogenic Virus Promotes Cell Survival and Cellular Transformation by Suppressing Glycolysis. *PLoS Pathog* **12**, e1005648 (2016).
36. Mack, A. A. & Sugden, B. EBV Is Necessary for Proliferation of Dually Infected Primary Effusion Lymphoma Cells. *Cancer Res* **68**, 6963–6968 (2008).