

Strategie hamowania apoptozy przez wirusy zapalenia wątroby typu E i C

ZBIGNIEW WYŻEWSKI*), KAROLINA P. GREGORCZYK, MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Otrzymano 09.09.2013

Zaakceptowano 06.11.2013

Wyżewski Z., Gregorczyk K. P., Niemiałtowski M.

Mechanisms of apoptosis inhibition by hepatitis B and C

Summary

Apoptosis is one of the processes of programmed cell death (PCD) in multicellular organism, and it is mediated by an intracellular proteolytic cascade. During viral infections, the host cell is the environment of the pathogen replication cycle. HEV and HCV encode proteins that prevent apoptosis. The ORF2 protein of HEV is responsible for overexpression of antiapoptotic Hsp72 in cells. Envelope glycoproteins E1 and E2 inhibit apoptosis induced by the Fas/Fas-L system. They block the activity of caspase-8 – the enzyme whose inactive form is part of DISC. The core protein HCV is a positive regulator of protein c-FLIP expression. c-FLIP prevents the conversion of caspase-8 zymogen into the mature, active form of the enzyme. NS5A inhibits the activity of p38MAPK, prevents the efflux of potassium ions from the cell, and thereby counteracts apoptosis.

Keywords: HEV, HCV, apoptosis

Wirusy zasiedlające człowieka i zwierzęta stanowią w sumie jeden świat grupujący czynniki biologiczne wywołujące u nich różne choroby, w tym zakaźne i nowotworowe. Jednym z procesów kluczowych dla funkcjonowania organizmu jest apoptoza, która odgrywa wiodącą rolę w eliminacji komórek zakażonych wirusami. Jest zatem istotnym elementem systemu odporności przeciwwirusowej. Wirusy stosują wypracowane ewolucyjnie strategie zapobiegające programowanej śmierci komórki (programmed cell death, PCD), aby zachować środowisko cyklu replikacyjnego i powielić w nim swój materiał genetyczny. Apoptoza odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu homeostazy całego organizmu i jest procesem ściśle kontrolowanym w warunkach fizjologicznych. Deregulacja apoptozy ma swój udział w etiologii rozmaitych chorób nowotworowych, autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych (4).

Wirusy zapalenia wątroby: typu C (hepatitis C virus, HCV) i typu E (hepatitis E virus, HEV), mają genom w postaci pojedynczej nici RNA (ssRNA). Są zróżnicowane filogenetycznie: HCV należy do rodziny *Flaviviridae* (12), a HEV – *Hepeviridae* (21). Gospodarzem HCV jest człowiek, natomiast u psów występuje psi wirus zapalenia wątroby (canine hepa-

civirus, CHV) o bardzo wysokim stopniu homologii genu z HCV (14). Natomiast zakażenie wątroby HEV jest zoonozą, rozpowszechnioną wśród hodowców trzody chlewnej. Świnie stanowią rezerwuuar HEV. Zakażający je wirus może ulec przeniesieniu na człowieka w drodze bezpośredniego kontaktu ze zwierzęciem lub pośrednio, poprzez spożycie wieprzowiny (2, 5). Możliwy jest również odwrotny kierunek transmisji HEV: z człowieka na świnie (17).

W niniejszej pracy przedstawiono strategie hamowania apoptozy przez RNA wirusy zapalenia wątroby: HEV i HCV. Opisano oddziaływania wirusowych białek z elementami molekularnej aparatury komórkowej odpowiedzialnej za uruchomienie apoptotycznej śmierci komórki.

Apoptoza

Apoptoza, jeden z rodzajów PCD, to efekt zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowej stymulacji. Źródłem tej pierwszej mogą być takie bodźce, jak promieniowanie uv, niedobór czynników wzrostu, a także aktywacja receptorów śmierci przez ich ligandy. Sygnały wewnątrzkomórkowe mogą zostać wzbudzone przez stres powodujący uwolnienie cząsteczki cytochromu c z mitochondrium (31).

Apoptoza obejmuje serię uporządkowanych zdarzeń molekularnych i składa się z trzech faz: indukcji, egzekucji i fazy końcowej. W przebiegu pierwszej z nich,

*) Doktorant na dziennym studium doktoranckim na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie; kierownik studium i promotor: prof. dr hab. Marek Niemiałtowski.

komórka apoptotyczna traci kontakt z komórkami sąsiadującymi, a układ włókien jej cytoszkieletu ulega modyfikacjom, które uwidaczniają się w zmianach jej rozmiaru i wyglądu. W fazie egzekucji wewnątrz komórki wzrasta poziom jonów wapniowych, co pociąga za sobą aktywację komórkowych endonukleaz i kaspaz. Chromatyna ulega kondensacji i fragmentacji. Powstają ciała apoptotyczne, które w ostatniej fazie (końcowej), zostają sfagocytowane i zdegradowane (8, 10).

Białko ORF2 HEV

Genom wirusowy HEV zawiera trzy otwarte ramki odczytu (open reading frame, ORF): ORF1, ORF2 i ORF3. ORF2 koduje białko kapsydu wirusa, które jest kierowane do siateczki śródplazmatycznej (endoplasmic reticulum, ER) przez sekwencję sygnałową na N-końcu cząsteczki. ER, jako miejsce modyfikacji, zwijania i oligomeryzacji nowo zsyntetyzowanych białek, odgrywa istotną rolę w cyklu replikacyjnym HEV. Gromadzenie się białka ORF2 w ER może doprowadzić do aktywacji genu kodującego proapoptotyczne białko homologiczne do C/EBP (C/EPB homologous protein, CHOP) na drodze zależnej od czynnika aktywacji transkrypcji 4 (activating transcription factor 4, ATF4) i ATF6. Nadekspresja CHOP w komórce prowadzi do obniżenia syntezy białka chłoniaka B-komórkowego 2 (B-cell lymphoma 2 protein, Bcl-2), a także skutkuje translokacją proapoptotycznego białka X sprzężonego z Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein, Bax) do mitochondrium (13). Bax odpowiada za zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrium i uwolnienie cytochromu c do cytozolu (28).

Białko ORF2 jest pozytywnym regulatorem ekspresji genów dla białka szoku cieplnego 72 (heat shock protein 72, Hsp72) i jego kofaktora, Hsp40 (13). Hsp72 wykazuje antyapoptotyczne właściwości. Wiąże proapoptotyczne białko Bax, zapobiegając jego przemieszczeniu się do mitochondrium (9, 29). Ponadto Hsp72 może migrować do jądra komórkowego, gdzie wykazuje aktywność opiekuńczą względem znajdujących się tam białek (11). Gromadzenie się Hsp72 w karioplazmie powstrzymuje apoptozę (15). Tymczasem obecność białka ORF2 w komórce wiąże się ze wzrostem poziomu akumulacji Hsp72 w jądrze komórkowym (15). Białko ORF2 HEV wchodzi w bezpośrednie interakcje z Hsp72, w wyniku których uzyskuje prawidłową strukturę przestrzenną i unika degradacji przez proteasomy (13).

Hamowanie aktywności kaspazy-8 przez E1 i E2 HCV

W przewlekłym zakażeniu komórkowym HCV utrzymuje przy życiu komórkę gospodarza, chroniąc tym samym miejsce swojego cyklu replikacyjnego. W związku z powyższym stosuje strategię przeciwdziałania apoptozie, co sprzyja efektywnej patogenezie wirusowej (1).

E1 i E2, glikoproteiny osłonkowe HCV, odgrywają istotną rolę w zakażeniu wirusowym. Za ich pośrednictwem wirus wiąże się z powierzchnią komórki, a następnie wnika do jej wnętrza. E1 i E2 wykazują właściwości zarówno proapoptotyczne (6, 7) jak i antyapoptotyczne (19).

Aktywowane limfocyty T mają zdolność zabijania komórek eksponujących na swojej powierzchni receptory Fas. Łączą się z nimi za pośrednictwem białek błonowych Fas-ligand (Fas-L). Związanie Fas i Fas-L prowadzi do wytworzenia kompleksu sygnałowego indukującego śmierć (death-inducing signalling complex, DISC), który składa się z cząsteczki Fas, białka adaptacyjnego – domeny śmierci związanej z Fas (Fas-associated death domain, FADD) i nieaktywnego enzymu, pro-kaspazy-8. Aktywacja zymogenu to kolejny etap apoptotycznej ścieżki sygnałowej. E1 i E2 hamują apoptozę uruchamianą przez układ Fas/Fas-L, blokując aktywność kaspazy-8, co wpływa na wydłużenie czasu persystentnego zakażenia HCV permissywnej (19, 22).

Przeciwdziałanie aktywacji pro-kaspazy-8 przez białko rdzeniowe HCV

Białko rdzeniowe HCV zapobiega apoptozie inicjowanej przez czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α , TNF- α). Wiele dobrze poznanych i scharakteryzowanych ścieżek sygnałowych TNF, w tym indukcja apoptozy i aktywacja czynnika jądrowego κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B), wymaga udziału receptora 1 dla TNF (TNF receptor 1, TNFR1). TNFR1 zawiera domenę śmierci, niezbędną w procesie przekazywania proapoptotycznego sygnału. Podlega ona negatywnej regulacji ze strony związanego z nią białka wyciszającego domenę śmierci (silencer of death domain, SODD). SODD hamuje agregację TNFR1 i utrzymuje receptor w nieaktywnej, monomerycznej postaci. Połączenie TNF z TNFR1 znosi inhibicję proapoptotycznej aktywności sygnałowej TNFR1, promując agregację receptorów i uwalnianie SODD z domeny śmierci. Odslonięte domeny wiążą białko sprzężone z domeną śmierci TNFR1 (TNFR1-associated death domain protein, TRADD), które rekrutuje kolejne białka, FADD i prokaspazę-8 do DISC. Przekształcenie zymogenu do aktywnej postaci enzymu (kaspazy-8) uruchamia kaskadę molekularnych zdarzeń prowadzących do apoptozy. Badania wykazały, że białko rdzeniowe HCV nie zakłóca oddziaływań pomiędzy TNFR1-TRADD, podobnie jak i interakcji TRADD-FADD-pro-kaspaza-8. Wykazano natomiast, że przeciwdziała konwersji pro-kaspazy-8 do kaspazy-8, podtrzymując ekspresję białka hamującego podobnego do komórkowego FLICE (cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP), endogennego inhibitora kaspazy-8 (27).

Oddziaływanie NS5A HCV na p38MAPK

NS5A to jeden z produktów proteolitycznego cięcia wirusowej poliproteiny, kodowanej przez genom HCV.

NS5A przeciwdziała apoptozie indukowanej stresem oksydacyjnym (23).

NS5A wiąże się z niektórymi białkami komórkowymi za pośrednictwem motywów poliprolinowych (PxxPxR) (18, 30). Wymienione układy aminokwasów tworzą wydłużone, heliakalne struktury i wiążą się z domenami homologicznymi do Src 3 (Src homology 3 domains), wykrywanymi w komórkowych cząsteczkach sygnałowych (1).

Kinazy białkowe aktywowane mitogenem p38 (P38 mitogen activated protein kinases, p38MAPK), biorą udział w procesie indukcji apoptozy w reakcji na rozmaite stresse, na przykład – temperaturowy i oksydacyjny (25) lub wywołany cytokinami (16). W odpowiedzi na ten ostatni aktywowana P38MAPK fosforyluje białko Kv2.1, które jest odpowiedzialne za odpływ K⁺ z komórki gospodarza. Wzrost aktywności bramkowanych elektrycznie kanałów potasowych, współodpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy jonowej w komórce, skutkuje inicjacją procesu apoptozy (24, 26). NS5A HCV przeciwdziała aktywacji Kv2.1., unieczynnając p38MAPK. Fragmentem p38MAPK, z którym oddziałuje NS5A, jest motyw PP2 (20).

Podsumowanie

HEV i HCV kontrolują proces apoptozy komórki gospodarza. Jego regulacja może mieć charakter pozytywny lub negatywny. Do wirusowych białek, które mogą wykazywać właściwości antyapoptotyczne, należą: białko ORFF2 HEV, produkt proteolitycznego cięcia poliproteiny HCV – NS5A, glikoproteiny osłonowe HCV – E1 i E2 oraz białko rdzeniowe HCV. Podejmują one bezpośrednie lub pośrednie oddziaływania z elementami molekularnej aparatury, odpowiedzialnej za apoptozę komórki gospodarza. Deaktywują ogniwa szlaków indukcji śmierci komórki lub pozytywnie regulują ekspresję białek zakłócających transdukcję proapoptotycznych sygnałów.

Piśmiennictwo

- Amako Y., Igloi Z., Mankouri J., Kazlauskas A., Saksela K., Dallas M., Peers C., Harris M.: Hepatitis C virus NS5A inhibits mixed lineage kinase 3 to block apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2013.
- Bihl F., Negro F.: Hepatitis E virus: a zoonosis adapting to humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010, 65, 817-821.
- Chami M., Ferrari D., Nicotera P., Paterlini-Bréchet P., Rizzuto R.: Caspase-dependent alterations of Ca²⁺ signaling in the induction of apoptosis by hepatitis B virus X protein. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 31745-31755.
- Chmielewski M., Radkowski M.: Apoptoza w wirusowym zapaleniu wątroby typu C. *Post. N. Med.* 2010, 10, 794-799.
- Christou L., Kosmidou M.: Hepatitis E virus in the Western world – a pork-related zoonosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013, 19, 600-604.
- Ciccaglione A. R., Marcantonio C., Costantino A., Equestre M., Rapicetta M.: Expression of HCV E1 protein in baculovirus-infected cells: effects on cell viability and apoptosis induction. *Intervirology* 2003, 46, 121-126.
- Ciccaglione A. R., Marcantonio C., Tritarelli E., Equestre M., Magurano F., Costantino A., Nicoletti L., Rapicetta M.: The transmembrane domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein induces cell death. *Virus Res.* 2004, 104, 1-9.
- Fuentes-Gonzales A. M., Contreras-Paredes A., Manzo-Merino J., Lizano M.: The modulation of apoptosis by oncogenic viruses. *Virology* 2013, 10, 182.
- Gotoh T., Terada K., Oyadomari S., Mori M. L.: hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004, 11, 390-402.
- Hacker G.: The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000, 301, 5-17.
- Hageman J., Vos M. J., van Waarde M. A., Kampinga H. H.: Comparison of intra-organellar chaperon capacity for dealing with stress-induced protein unfolding. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 34334-34345.
- Hsu S. H., Yeh M. L., Wang S. N.: New insights in recurrent HCV infection after liver transplantation. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 2013, 890517.
- John L., Thomas S., Herchenröder O., Pützer B. M., Schaefer S.: Hepatitis E virus ORF2 protein activates the pro-apoptotic gene CHOP and anti-apoptotic heat shock proteins. *PLoS ONE* 2011, 6, e25378.
- Kapoor A., Simmonds P., Gerold G., Qaisar N., Jain K., Henriquez J. A., Firth C., Hirschberg D. L., Rice C. M., Shields S., Lipkin W. I.: Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 11608-11613.
- Kato K., Yamanaka K., Hasegawa A., Okada S.: Dimethylarsinic acid exposure causes accumulation of Hsp72 in cell nuclei and suppresses apoptosis in human alveolar cultured (L-132) cells. *Biol. Pharm. Bull.* 1999, 22, 1185-1188.
- Kumar S., Boehm J., Lee J. C.: p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 717-726.
- Lu L., Li C., Hsgeodorn C. H.: Phylogenetic analysis of global hepatitis R virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 2006, 16, 5-36.
- Macdonald A., Crowder K., Street A., McCormick C., Harris M.: The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 721-729.
- Machida K., Tsukiyama-Kohara K., Seike E., Toné S., Shibasaki F., Shimizu M., Takahashi H., Hayashi Y., Funata N., Taya C., Yonekawa H., Kohara M.: Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 12140-12146.
- Mankouri J., Dallas M. L., Hughes M. E., Griffin S. D., Macdonald A., Peers C., Harris M.: Suppression of a pro-apoptotic K⁺ channel as a mechanism for hepatitis C virus persistence. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 15903-15908.
- Mayo M. A.: Changes to virus taxonomy. 2004, *Arch. Virol.* 2005, 150, 189-198.
- Nowicka A., Batura-Gabryel H., Młynarczyk W.: Czy proces apoptozy odgrywa rolę w patogenezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc? *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004, 72, 66-69.
- Qiu D., Lemm J. A., O'Boyle D. R., Sun J. H., Nower P. T., Nguyen V., Hamann L. G., Snyder L. B., Deon D. H., Ruediger E., Meanwell N. A., Belema M., Gao M., Fridell R. A.: The effects of NS5A inhibitors on NS5A phosphorylation polyprotein, processing and localization. *J. Gen. Virol.* 2011, 92, 2502-2511.
- Pal S., Hartnett K. A., Nerbonne J. M., Levitan E. S., Aizenman E.: Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels. *J. Neurosci.* 2003, 23, 4798-4802.
- Pearce A. K., Humphrey T. C.: Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways *Trends Cell. Biol.* 2001, 11, 426-433.
- Redman P. T., He K., Hartnett K. A., Jefferson B. S., Hu L., Rosenberg P. A., Levitan E. S., Aizenman E.: Apoptotic surge of potassium currents is mediated by p38 phosphorylation of Kv2.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 3568-3573.
- Saito K., Meyer K., Warner R., Basu A., Ray R. B., Ray R.: Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Apoptosis by a Protective Effect Involving Cellular FLICE Inhibitory Protein. *J. Virol.* 2006, 80, 4372-4379.
- Schellenberg B., Wang P., Keeble J. A., Rodriguez-Enriquez R., Walker S., Owens T. W., Foster F., Talianis-Hughes J., Brennan K., Streuli C. H., Gilmore A. P.: Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol. Cell.* 2013, 49, 959-971.
- Stankiewicz A. R., Lachapelle G., Foo C. P., Radicioni S. M., Mosser D. D.: Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 38729-38739.
- Tan S. L., Nakao H., He Y., Vijaysri S., Neddermann P., Jacobs B. L., Mayer B. J., Katze M. G.: NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptorbound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 5533-5538.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N.: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* 2005, 84, 627-663.

Adres autora: mgr Zbigniew Wyżewski, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: zbigniew.wyzewski@gmail.com