

Granule stresu i ciała degradujące – ważne mechanizmy obronne w zakażeniach wirusowych

PAULINA NIEDŹWIEDZKA-RYSTWEJ, BEATA TOKARZ-DEPTUŁA, WIESŁAW DEPTUŁA*

Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

*Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Otrzymano 25.09.2013

Zaakceptowano 20.01.2014

Niedźwiedzka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.

Stress granules and processing bodies: Important mechanisms in viral infections

Summary

It has been shown that, in addition to the mechanisms of the immune system, other systems as well are involved in the suppression of viral infections in macroorganisms. These systems include cell structures, such as RNA granules, i.e. stress granules (SG) and processing bodies (PB), which fight infections by protecting cellular mRNA. Their action consists in creating conditions favourable for the genetic material of the cell by placing it inside the RNA granule and stopping the biosynthesis of proteins.

Keywords: viral infections, RNA granules, stress granules, processing bodies

Ekspozycja komórek na stres, wywołany między innymi zakażeniami wirusowymi, oprócz aktywacji elementów układu odpornościowego, uruchamia także inne mechanizmy likwidujące przyczyny tego stanu, które mają za zadanie magazynować materiał genetyczny na czas zakażenia i są nimi struktury komórkowe, określane jako granule RNA, reprezentowane przez granule stresu (SG – stress granules) oraz ciała degradujące (PB – processing bodies) (2). W czasie zagrożenia dochodzi w nich do zatrzymania biosyntezy białka oraz ochrony komórkowego mRNA poprzez „zamknięcie” w ich wnętrzu (18). Struktury te opisano po raz pierwszy u *Caenorhabditis elegant* oraz u *Drosophila melanogaster*, lecz zakłada się, że są to konserwatywne i „stare” ewolucyjnie elementy, występujące u wielu organizmów eukariotycznych, w tym u ssaków (18). Granule stresu (SG) i ciała degradujące (PB) występują głównie w cytoplazmie, choć także jako mRNP w jądrze, z tym, że SG są strukturami dynamicznymi, pojawiającymi się w momencie występowania niesprzyjających warunków, natomiast PB występują w komórkach w formie uśpionej i uaktywniają się w momencie potencjalnego zagrożenia, np. zakażenia wirusowego (18, 21).

Charakterystyka granul stresu (SG) i ich roli w zakażeniach wirusowych

SG to struktury cytoplazmatyczne w komórkach wielu organizmów, które cechują się dużą koncentracją czynników inicjujących translację, podjednostek

rybosomu 40S oraz szeregu białek, takich jak m.in.: Ago2 (argonaute protein), eIF4e (eukaryotic translation initiation factor 4E), APOBEC3 (polipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G), PCB2 (3,8-divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl reductase), TTP (tristetraprolin), występujących również w ciałkach degradujących (2, 4, 18, 21). Ponadto w SG znajdują się także białka wiążące RNA, takie jak TIA-1 (cytotoxic granule-associated RNA binding protein) i G3BP (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1), które zawierają domeny istotne dla agregacji granul stresu i są elementami wyciszającymi komórkowy mRNA (2, 4). Ze względu na zawartość w SG kompleksów inicjujących podjednostki głównie rybosomu 43S i 48S, stanowią one tymczasowe „magazyny” tych podjednostek, dzięki czemu w momencie stresu np. oksydacyjnego w komórce, kompleksy te mogą w szybkim tempie zostać uaktywnione (18). Występują w nich także białka, które nie są w sposób jednoznaczny związane z metabolizmem RNA, takie jak TRAF 2 (TNF-receptor associated factor 2), fako-fylina 1 i 3, będące elementami cytoszkieletu komórki, co może mieć szczególne znaczenie dla SG w zakażeniach wirusowych (2). Początkowo uważano, że SG są jedynie pasywnymi magazynami funkcjonalnego mRNA, które akumuluje się podczas warunków niekorzystnych dla komórki, jednakże w późniejszym czasie okazało się, że SG może w wyniku takiej akumulacji chronić komórkowy mRNA i ponownie inicjować jego translację, gdy warunki staną się korzystne (2).

Zakłada się (18), że najbardziej prawdopodobny scenariusz tworzenia się SG, pod wpływem stresu wskutek np. zakażenia wirusowego, rozpoczyna się aktywacją jednej z kinaz $eIF2\alpha$, która fosforyluje podjednostkę alfa tej kinazy i blokuje translację, wymuszając w ten sposób akumulację aktywnych kompleksów 43S i 48S (18) i jest to charakterystyczna cecha jedynie dla SG (2). Stwierdzono, że nie zawsze aktywacja SG i ich zawartość jest jednakowa, gdyż zależy to od rodzaju czynnika niekorzystnego oddziałującego na komórki makroorganizmu (18). Wykazano, że na skutek stresu wywołanego szokiem cieplnym, tworzą się HS-SG (heat shock SG), zawierające dużą koncentrację białka szoku cieplnego hsp27 (18), zaś pod wpływem działania czynników chemicznych, np. arsenu, tworzą się Ars-SG (arsenite SG). Natomiast w wyniku stresu powstającego jako efekt zakażenia wirusowego tworzą się V-SG (viral SG). Stres prowadzi do wstępnego łączenia się SG, co związane jest z działaniem białek wiążących RNA, takich jak: TIA-1 (cytotoxic granule-associated RNA binding protein), CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein), G3BP (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1) oraz czynników BRF1 (TBP associated factor 1), FMRP (fragile X mental retardation 1), SMN (survival of motor neuron), a także receptorów TIAR (cytotoxic granule-associated RNA binding protein receptor) i genu FXR1 (gene coding fragile X mental retardation 1) oraz powstawaniem „jądra” granul stresu (2). W czasie, gdy „jądro” SG jest już w pewnym stopniu ukonstytuowane przez wyżej wymienione elementy, następuje tworzenie się „pnia” SG, przez małe jednostki rybosomalne, to jest $eIF3$ i $eIF4F$ (eukaryotic translation initiation factor) oraz białko PABP-1 (poly(A)-binding protein 1) (2). Następnie dochodzi do tzw. drugorzędowej agregacji – łączenia, w wyniku której SG stają się strukturami większymi – widzialnymi w mikroskopie i mającymi zdolność do przekazywania sygnałów w obrębie całej komórki (2). Należy także wspomnieć o roli białek będących składnikami cytozolu, których zadanie polega na „eskortowaniu” mRNA do i z SG, takich jak TTP (tristetraprolin), BFR1 (TBP associated factor 1) i ZBP1 (zipcode-binding protein 1) (2). W przypadku ustabilizowania się sytuacji w komórce, w przeciągu kilku minut, dochodzi do rozpadu SG, co w obrazie mikroskopowym przypomina bardziej rozpuszczenie niż defragmentację.

Dotychczas rolę SG udokumentowano w procesie nowotworzenia, gdyż struktury te tworzą się w wyniku działania radioterapeutycznego (14), a także w chorobach genetycznych, takich jak zespół łamliwego chromosomu X (8), rdzeniowy zanik mięśni (16), jak też w zespole poreperfuzyjnym (10), a nade wszystko w zakażeniach wirusowych (1-4, 6, 11-13, 17, 18, 20, 21). Udział SG w zakażeniach wirusowych realizowany jest w postaci trzech mechanizmów (18). Pierwszy z nich dotyczy indukcji tworzenia się SG,

drugi związany jest z blokowaniem SG, zaś trzeci mechanizm polega na modulowaniu elementów SG poprzez wirusy, co prowadzi nie tylko do zaburzenia działania SG, ale także oddziałuje na inne procesy warunkujące rozwój zakażenia (18).

Do wirusów działających w ramach pierwszego mechanizmu, tj. powodujących indukcję tworzenia się SG, należą ortoreowirusy ssacze, wirus polio oraz mysi wirus encefalopatii, indukujące powstawanie SG, a następnie w późniejszej fazie zakażenia, m.in. na skutek hamowania działania białka G3BP1, hamujące ich rozwój (19, 22). Natomiast do grupy wirusów działających w ramach drugiego mechanizmu, tj. blokowania SG, należy wirus grypy A, rotawirusy oraz ludzki wirus T-limfotropowy (11, 12, 17, 18). W przypadku wirusa grypy wykazano (11), że proces blokowania SG wiązany jest z ekspresją białka NS (influenza non-structural protein), gdyż wariant NS1 tego białka nie łączy się z dsRNA, co powoduje brak stymulacji fosforylacji czynnika transkrypcyjnego $eIF2\alpha$, który jest początkowym sygnałem do tworzenia się SG (18). Podobny proces ma miejsce w przypadku rotawirusów, gdzie białkami, które wpływają na blokowanie SG, są białka VP2, NSP2 i NSP5 tego wirusa (17). Natomiast w przypadku ludzkiego wirusa T-limfotropowego wykazano (12), że przyczyną blokowania SG jest białko Tax, wchodzące w interakcję z czynnikiem HDAC6 (histone deacetylase 6), bez aktywności którego nie dojdzie do formowania się SG (12). Do trzeciej grupy wirusów, które potrafią modulować działanie SG, jako że ich replikacja zaburza funkcjonowanie SG, należą: wirus Sindbis, Zachodniego Nilu, Dengue, Hepatitis typu C (HCV), HIV oraz ludzkie herpeswirusy HHV1 i HHV2 (1, 3, 6, 13, 18, 20). W przypadku wirusa Sindbis wykazano (6), że jego nsP4 – RNA-zależna RNA polimeraza wchodzi w interakcję z białkami G3BP1 i 2, udostępniając wirusowi dostęp do komórkowego mRNA zgromadzonego w SG. Tymczasem mechanizm działania wirusów Zachodniego Nilu i Dengue, polega na tym, że fosforylowana kinaza $eIF2\alpha$ SG nie syntetyzuje się w obecności tych wirusów, co zakłóca proces formowania się SG (13). Ponadto w przypadku wirusa Dengue wykazano (13), że białko G3BP1, może wiązać się z tym wirusem, co powoduje, że SG zamiast chronić ukryte w nim mRNA, wzmagają translację wirusa lub replikację jego RNA. Co się tyczy mechanizmu wpływu HCV na formowanie się i funkcjonowanie SG, to wiele pytań wciąż pozostaje bez odpowiedzi, gdyż dotychczas nie stwierdzono, które z białek tego wirusa łączy się z elementami strukturalnymi SG i nie do końca wiadomo, czy G3BP1, jest zaangażowane w replikację HCV (3). Natomiast w przypadku HIV wykazano (1), że może on wpływać na różne etapy formowania się SG. Przypuszcza się, że działanie to może mieć związek z sekwestracją, tj. czynnościowym unieczynnieniem białka Staufen1 do rybonukleoproteiny zawierającej białko wirusowe Gag, co powoduje „oszukanie” SG

i tworzenie ich struktur z elementów wirusowych (1). Natomiast w przypadku HHV1, sugeruje się (20), że rola SG może dotyczyć regulacji jego latencji w neuronach, a mechanizm takiego działania wiązałby się z modulowaniem ekspresji białka Pbp1 (calcium binding protein).

Charakterystyka ciałek degradujących (PB) i ich rola w zakażeniach wirusowych

PB, tak jak SG, są strukturami głównie cytoplazmatycznymi w komórkach wielu organizmów eukariotycznych, które są stałym elementem komórki, nie tworzącym się tak jak SG tylko w czasie niesprzyjających warunków (4, 5, 18). PB składają się z wielu enzymów i białek fizjologicznie występujących w komórkach tych organizmów, w stanie spoczynku i choć nieznana jest wciąż ich kompletna budowa i zawartość, udokumentowano, że w PB występują enzymy Dcp1/Dcp2 (decapping enzymes) i eksonukleazy Xrn1 (4). Podstawą mechanizmu molekularnego tworzenia się PB jest agregacja białek łączących RNA na zasadzie białko-białko, jak też samego mRNA, czego konsekwencją jest fakt, że PB łatwo ulegają degradacji, chociażby na skutek działania RNaz (4, 18). Przypuszcza się, że PB współdziałają z SG poprzez dynamiczną wymianę swoich zawartości (18). Ponadto istnieje także przypuszczenie, że po ustabilizowaniu się „warunków” w komórce, kiedy nie zachodzi już potrzeba formowania się SG, mRNA może być w komórce przechowywany właśnie w PB w celu późniejszej translacji (4). W odróżnieniu od SG, w przypadku PB, mówi się jedynie o ich roli w zakażeniach wirusowych, podczas których PB oddziałują poprzez dwa mechanizmy – pierwszy polega na „rozpraszaniu” tych struktur i ich komponentów, a drugi dotyczy modulowania funkcji PB, by ich elementy przyczyniały się do rozprzestrzenienia się infekcji wirusowej (4, 5, 18).

Wśród wirusów działających „rozpraszająco” na struktury PB (mechanizm pierwszy) wymienia się: poliovirus, wirus Cocksackie, adenowirusy i wirus grypy typu A (18). W przypadku wirusa polio i Cocksackie wykazano (7), że rozproszenie PB następuje poprzez rozpad kluczowych elementów tej struktury, jak Xrn1 czy Dcp1a, a zatem PB nie ma już racji bytu. Natomiast w przypadku zakażenia adenowirusami zarejestrowano (9), że białko E4 11K tych wirusów powoduje redystrybucję elementów PB do tzw. agresomu komórkowego, tj. tworzy występującego w komórce, który zawiera denaturowane białka z proteasomami i ubikwitiną, powodując, że PB maleją nawet o jedną trzecią, a ich zawartość przeznaczona zostaje do zniszczenia, np. na drodze apoptozy. Natomiast mechanizm działania wirusa grypy typu A polega na interakcji białka wirusowego NS1 z białkiem inhibitorowym PB – Rap55 (RNA-associated protein 55) (15). Tymczasem drugi mechanizm, dotyczący interakcji PB z białkami wirusa, rejestrowany był dotychczas przy wirusie żółtej febry, Dengue i Zachodniego Nilu. Wykazano, że dla

prawidłowej replikacji tych wirusów niezbędny jest czynnik eksonukleazy Xrn1, który jest także kluczowy dla prawidłowego funkcjonowania PB, stąd „wykorzystanie” Xrn1 przez wirusy w celu ich prawidłowej replikacji powoduje zaburzenia w działaniu PB (18).

Sprzeczne dane pojawiają się w stosunku do HIV i jego wpływu na PB, jako że badania wskazują (18), że wirus ten nie oddziałuje na PB, a tylko na SG, natomiast inne dane podają, że dochodzi do interakcji z elementami PB, co wspomaga replikację HIV. Również badania dotyczące wirusa hepatitis typu C (HCV) (5, 18), wykazały, że białko tego wirusa reaguje z helikazą DDX3 (RNA helicase) PB. Ponadto stwierdzono (5), że replikacja HCV jest wzmagana poprzez interakcję wirusowego RNA z miRNA122, który wiąże się z niekodującym końcem 5' genomu HCV. Ta ostatnia informacja wydaje się zaskakująca, jako że przyjmuje się, że jedną z funkcji miRNA jest zdolność do ukierunkowywania mRNA jako elementów PB (5).

Podsumowanie

Mimo wielu danych związanych z układem odpornościowym, który warunkuje obronę makroorganizmu, przedstawione fakty wskazują na istnienie dodatkowych mechanizmów uruchamianych w komórkach makroorganizmu w celu ich ochrony, w tym w czasie zakażenia wirusowego. Dane dotyczące tych istotnych dla makroorganizmu struktur komórkowych, tj. granul stresu (SG) i ciałek degradujących (PB), wskazują, że stanowią one mechanizm obronny makroorganizmu, poza układem odpornościowym i mogą stać się potencjalną bronią w ograniczaniu np. infekcji wirusowych u ssaków.

Piśmiennictwo

1. Abrahamyan L. G., Chatel-Chaix L., Ajamian L., Milev M. P., Monette A., Clément J.-F., Song R., Lehmann M., DesGroseillers L., Laughrea M., Boccaccio G., Moulard A. J.: Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formatting of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J. Cell. Sci.* 2010, 123, 369-383.
2. Anderson P., Kedersha N.: Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 2007, 33, 141-150.
3. Ariumi Y., Kuroki M., Kushima Y., Osugi K., Hijikata M., Maki M., Kieda M., Kato N.: Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol.* 2011, 85, 6882-6892.
4. Balagopal V., Parker R.: Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009, 21, 403-408.
5. Beckham C. J., Parker R.: P bodies, stress granules, and viral cycles. *Cell Host Microbe* 2008, 3, 206-212.
6. Crestea I. M., Rozjabek H., Molloy K. R., Karki S., White L. L., Rice C. M., Rout M. P., Chait B. T., MacDonald M. R.: Host factors associated with Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase: role for G3BP1 and G3BP2 in virus replication. *J. Virol.* 2010, 84, 6720-6732.
7. Dougherty J. D., White J. P., Lloyd R. E.: Poliovirus-mediated disruption of cytoplasmic processing bodies. *J. Virol.* 2011, 85, 64-75.
8. Garber K., Smith K. T., Reines D., Warren S. T.: Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006, 16, 270-275.
9. Greer A. E., Hearing P., Ketner G.: The adenovirus E4 11K protein binds and relocates the cytoplasmic P-body component Ddx6 to aggresomes. *Virology* 2011, 417, 161-168.
10. Kayali F., Montie H. L., Rafols J. A., DeGracia D. J.: Prolonged translation arrest in reperfused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules. *Neuroscience* 2005, 134, 1223-1245.
11. Khaperskyy D. A., Hachette T. F., McCormick C.: Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation. *FASEB J.* 2011, 26, 1629-1639.

12. Legros S., Boxus M., Gatot J. S., Van Lint C., Kruys V., Kettmann R., Twizere J. C., Dequiedt F.: The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6. *Oncogene* 2011, 30, 4050-4062.
13. Li W., Li Y., Kedersha N., Anderson P., Emara M., Swiderek K. M., Moreno G. T., Brinton M. A.: Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J. Virol.* 2002, 76, 11989-12000.
14. Moeller B. J., Cao Y., Li C. Y., Dewhirst M. W.: Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004, 5, 429-441.
15. Mok B., Song W.-Y., Wang P., Tai H., Chen Y., Zheng M., Wen X., Lau S.-Y., Wu W. L., Matsumoto K., Yuen K.-Y., Chen H.: The NS1 protein of influenza virus interacts with cellular processing bodies (P-bodies) and stress granules through RNA-associated protein 55 (RAP55) during virus infection. *J. Virol.* 2012, 86, 12695-12707.
16. Monani U. R.: Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 2005, 48, 885-896.
17. Montero H., Rojas M., Arias C. F., López S.: Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 2008, 82, 1496-1504.
18. Reineke L. C., Lloyd R. E.: Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection. *Virology* 2013, 436, 255-267.
19. Smith J. A., Schmechel S. C., Raghavan A., Abelson M., Reilly C., Katze M. G., Kaufman R. J., Bohjanen P. R., Schiff L. A.: Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* 2006, 80, 2019-2033.
20. Takahara T., Maeda T.: Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol. Cell.* 2012, 47, 242-252.
21. Valiente-Echeverría F., Melnychuk L., Moulard A. J.: Viral modulation of stress granules. *Vir. Res.* 2012, 169, 430-437.
22. White J. P., Cardenas A. M., Marissen W. E., Lloyd R. E.: Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe* 2007, 2, 295-305.

Adres autora: prof. dr hab. Wiesław Deptuła, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl