

Wandtke Tomasz, Wędrowska Ewelina, Goede Arkadiusz, Owczarska Paulina, Piskorska Elżbieta, Kopiński Piotr. Role of endoplasmic-reticulum-associated protein degradation pathway in the virus infection cycle. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(8):607-635. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.890229>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4801>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).

1223 *Journal of Education, Health and Sport* eISSN 2391-8306 7

© The Authors 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 01.08.2017. Revised: 10.08.2017. Accepted: 31.08.2017.

Znaczenie zależnego od retikulum endoplazmatycznego szlaku degradacji białek wewnątrzkomórkowych w cyklu infekcyjnym wirusów

Role of endoplasmic-reticulum-associated protein degradation pathway in the virus infection cycle

Tomasz Wandtke¹, Ewelina Wędrowska¹, Arkadiusz Goede¹, Paulina Owczarska¹,
Elżbieta Piskorska², Piotr Kopiński¹

¹Zakład Genoterapii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

²Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

¹Department of Gene Therapy, Faculty of Medicine, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

²Department of Pathobiochemistry and Clinical Chemistry, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

Streszczenie

Wprowadzenie: Proces degradacji białek zależny od retikulum endoplazmatycznego (ang. endoplasmic-reticulum-associated protein degradation - ERAD) odgrywa istotną rolę w utrzymaniu stanu homeostazy wewnątrzkomórkowej i dotyczy przede wszystkim białek, które nie uzyskały posttranslacyjnie prawidłowej konformacji. Mechanizm ten może zostać wykorzystany przez wirusy, zwykle celem uniknięcia detekcji przez układ odpornościowy gospodarza. Zależnie od typu wirusa, rodzaj i sposób degradacji białek bywa odmienny.

Cel pracy: Celem pracy jest przedstawienie mechanizmu ERAD oraz jego znaczenia dla cyklu infekcyjnego wybranych cząsteczek wirusowych. Dokładne poznanie tego procesu może istotnie przyczynić się do wskazania potencjalnie skutecznych, nowych przeciwwirusowych rozwiązań terapeutycznych.

Skrócony opis stanu wiedzy: W pracy omówiono mechanizm ERAD i jego wykorzystanie przez: Poliomawirusy (BK i SV-40), Herpeswirusy (Cytomegalowirus), Retrowirusy (HIV-I) oraz Hepadnawirusy (HBV).

Podsumowanie: Znaczenie ERAD w cyklu infekcyjnym wirusów jest niezwykle istotne w przebiegu zakażenia. Należy dalej badać możliwość wykorzystywania ERAD przez inne rodzaje wirusów. Warto również monitorować skuteczność inhibitorów proteasomu jako potencjalnych leków w walce z chorobami wirusowymi.

Słowa kluczowe: ERAD, Herpeswirusy, HBV, HIV-I, Poliomawirusy, retikulum endoplazmatyczne

Summary

Introduction: The endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD) pathway plays an important role in maintaining intracellular homeostasis and primarily affects proteins that have not achieved correct post-translational conformation. ERAD can be also exploited by viruses, usually in order to avoid detection by the host's immune system. Depending on the type of virus, the character and manner of protein degradation may be different.

Aim of the study: The aim of this paper is to present the ERAD mechanism and its importance for the infection cycle of select viral particles. Gaining knowledge about this process can help to identify potentially effective new antiviral therapies.

Short description of state of knowledge: The ERAD mechanism and its utilization by: Poliomaviruses (BK and SV-40), Herpesviruses (Cytomegalovirus), Retroviruses (HIV-I) and Hepadnaviruses (HBV) are discussed in the paper.

Summation: The ERAD process in the viral infection cycle is extremely important. The possibility of using ERAD by different viruses should be further investigated. It could be also useful to exploit proteasome inhibitors as potential drugs in the fight against viral diseases.

Key words: ERAD, Herpesviruses, HBV, HIV-I, Poliomaviruses, endoplasmic reticulum

Wprowadzenie

Retikulum endoplazmatyczne to dwuwarstwowa błona, wewnątrz której występują odrębne domeny, kształtowane przez: interakcje z cytoszkieletem, białka stabilizujące membranę i homotypową fuzję [1]. Jest jednym z organelli w komórkach eukariotycznych, potrzebnym do pełnienia funkcji takich jak: transport wewnątrzkomórkowy, podział cytoplazmy na przedziały, udział w syntezie białek, steroidów i tłuszczu [2], uwalnianie i gromadzenie jonów wapnia (co jest procesem kluczowym dla prawidłowego fałdowania białek) oraz uczestnictwo w apoptozie komórki [3]. Struktura retikulum została zwizualizowana za pomocą mikroskopu elektronowego, gdzie największą różnicę zaobserwowano między gładką, a szorstką siateczką śródplazmatyczną. Szorstka siateczka śródplazmatyczna ma strukturę ziarnistą ze względu na obecność rybosomów na jej powierzchni, natomiast gładkie retikulum jest bardziej pofałdowane. Pomiędzy szorstką, a gładką siateczką występuje struktura o charakterze przejściowym. Oba rodzaje siateczki posiadają podobny zestaw białek błonowych, jednak niektóre z nich zaangażowane w proces translokacji lub obróbki nowo zsyntetyzowanych białek są obecne tylko na siateczce szorstkiej. Gładkie retikulum endoplazmatyczne pełni odmienną rolę w zależności od typu tkanki, np. w komórkach wątroby bierze udział w detoksykacji substancji hydrofobowych, a w mięśniach odpowiada za uwalnianie jonów wapnia [4].

Siateczka śródplazmatyczna kontaktuje się z innymi błonowymi organellami komórkowymi takimi jak: błona komórkowa, mitochondria, aparat Golgiego, endosomy, peroksosomy, ciała tłuszczowe [1]. Pełni rolę „portu” dla większości nowo zsyntetyzowanych białek. Cząsteczki, które nie podlegają związaniu z siateczką, są transportowane w formie pęcherzyków do aparatu Golgiego, gdzie zapada decyzja o ich dalszym losie. W jej wyniku, białka zostają przekazane do odpowiedniego miejsca w komórce lub podlegają sekrecji [5].

Aktualnie uznaje się, że aż 30% nowo zsyntetyzowanych białek jest nieprawidłowo sfałdowana. Produkty takie nie mogą samodzielnie zmienić swojej konformacji, przez co nie pełnią swojej funkcji [6].

Jedną z podstawowych funkcji ER jest weryfikacja pofałdowania białek. Proces kontrolny ERQC (ang. Endoplasmic Reticulum Quality Control) obejmuje rozpoznanie białek o wadliwej konformacji i przekazanie ich na drogę degradacji [6].

Kontrola białek po obróbce potranslacyjnej (ERQC) odbywa się przed ich transportem do właściwego miejsca w komórce. Białka nieprawidłowo sfałdowane, rozpoznane w trakcie kontroli, podlegają naprawie lub przekazaniu na drogę degradacji z wykorzystaniem szlaku ERAD. Mechanizm procesu kontroli jakości białek ERQC nie jest w pełni wyjaśniony, natomiast wyodrębniono poszczególne etapy procesu. Wyróżnia się trzy punkty kontrolne ERQC, ze względu na różnorodność substratów ERAD. Białka mogą być rozpuszczone w cytozolu lub związane z ER, dodatkowo uwzględnia się budowę domen białka.

Punkty kontrolne ERQC:

1. Punkt kontrolny ERAD – C: kontrola domen cytozolowych białek błonowych. Wykrycie nieprawidłowości prowadzi do degradacji białka
2. Punkt kontrolny ERAD – L: kontrola domen luminalnych białek błonowych związanych i rozpuszczonych w ER (nie zawierających domen cytozolowych), podobnie jak ERAD – C prowadzi do degradacji białka
3. Punkt kontrolny ERAD – M: monitoruje domeny błonowe białek. Nie jest dokładnie poznany.

Funkcję kontroli może również spełniać aparat Golgiego, szczególnie podczas stresu retikulum endoplazmatycznego [7].

Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie mechanizmu ERAD ze szczególnym naciskiem na model ERAD I oraz jego znaczenia dla cyklu infekcyjnego wybranych cząsteczek wirusowych. Dokładne poznanie tego procesu może istotnie przyczynić się do wskazania potencjalnie skutecznych, nowych przeciwwirusowych rozwiązań terapeutycznych.

Skrócony opis stanu wiedzy

Proces ERAD zachodzi w komórkach eukariotycznych. Jest to mechanizm konserwatywny ewolucyjnie [6]. Podczas procesu ERAD białka niesfałdowane lub sfałdowane niepoprawnie są rozpoznawane oraz degradowane, a całość procesu można podzielić na cztery

etapy: rozpoznanie substratu, retrotranslokacja wzdłuż membrany retikulum endoplazmatycznego, poliubikwitynacja i degradacja przez proteasom [8].

Wyróżniamy dwa modele degradacji białek z udziałem retikulum endoplazmatycznego:

1. ERAD (I) (ubikwityna/proteasom), obejmujący proces ubikwitynacji i degradacji błędnie sfałdowanych białek w proteasomach komórkowych
2. ERAD (II) (autofagia/lizosom), który aktywuje proces autofagocytozy, uczestniczą w nim enzymy lizosomalne

Oba modele zależą od retrotranslokacji substratów ERAD z retikulum do cytoplazmy z pomocą kompleksu Cdc48p-p97 [2].

Model ERAD (I) jest częściej wykorzystywany, schemat jego działania i budowy, zostanie opisany szczegółowo w dalszej części pracy.

Model ERAD (II) polega na degradacji białek za pomocą autofagocytozy. W komórce powstają pęcherzyki otoczone dwuwarstwową błoną zwane autofagosomami, osiągające wielkość 300-900nm. Zawartość autofagosomów podlega hydrolizie za pomocą lizosomów [9].

Zdarza się, że proces degradacji białek w mechanizmie ERAD jest nieskuteczny, szczególnie gdy białko nie ulegnie sfałdowaniu w odpowiednim czasie. Rezultatem tego jest nieefektywna retrotranslokacja oraz brak degradacji białka przez proteasom. Niefunkcjonalny proces ERAD jest związany z takimi chorobami jak: zespół Alzheimera, zespół Parkinsona, mukowiscydoza, cukrzyca i niektóre nowotwory [6].

Podstawowym warunkiem dla zajścia ERAD jest translokacja białka wzdłuż błony retikulum endoplazmatycznego. Translacja większości z białek transbłonowych wymaga rozpoznania hydrofobowego peptydu sygnałowego (SP) przez czynnik SRP połączony z rybosomem. Częsteczką (SRP) jest związana z kompleksem Sec61 [6]. Sec61 jest heterotrimerem zbudowanym z trzech jednostek Sec61 α , Sec61 β i Sec61 γ , które tworzą kanały transportowe dla nieprawidłowo sfałdowanych białek [10]. Identyfikacja białka odbywa się na podstawie rozpoznania nieprawidłowych reszt węglowodanowych lub niewłaściwego sparowania wiązań disiarczkowych, czego skutkiem jest nieprawidłowa ekspozycja części hydrofobowej białka. Hydrofobowe fragmenty białka powinny znajdować się po wewnętrznej stronie sfałdowanego łańcucha polipeptydowego [8].

Proces ERAD jest istotny dla prawidłowego funkcjonowania komórki, jednak wciąż wiele etapów tego mechanizmu nie zostało dobrze scharakteryzowanych i opisanych [6].

W niniejszej pracy omówiony zostanie model ERAD I ze względu na częstsze wykorzystywanie go przez komórki.

Etapy ERAD - rozpoznanie substratu

W rozpoznaniu substratu uczestniczą białka opiekuńcze (ang. chaperons). Białka nieprawidłowo sfałdowane wiążą się z białkami opiekuńczymi (OS-9, osteosarcoma 9; XTP-3B, XTP3-transactivated gene B protein; BiP, binding immunoglobulin protein; EDEM 1-3, ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein; Herp, homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein), które transportują je do kompleksu ERQC, gdzie następnie niektóre z nich przenoszone są z retikulum do proteasomu. Białka opiekuńcze zapobiegają agregacji białek przeznaczonych do degradacji [11,12].

Alternatywnie, rozpoznanie substratu może nastąpić w udzialem mniej znanych białek opiekuńczych – lektyn. Lektyny rozpoznają substraty glikozylowane [13]. Białka mogą być O-mannozylowane lub N-glikozylowane. Oba typy glikozylacji wprowadzane są jako modyfikacje ko-translacyjne i są związane z translokacją, strukturą odpowiedzialną za transport białek przez błonę ER w kierunku cytoplazmy. O-mannozylotransferaza (PMT) i oligosacharylotransferaza (OST) to transbłonowe białka katalizujące reakcję dodawania węglowodanów do reszt argininy w łańcuchach polipeptydowych. Glikozylacja jest jednym z wyznaczników prawidłowego fałdowania białka [6]. N-glikozylacja polega na dodaniu do białek łańcuchów oligosacharydowych zawierających: dwie reszty N-acetyloglukozaminy, trzy reszty glukozy oraz dziewięć reszt mannozy [13]. Dwie reszty glukozy oddziałują z lektynami: kalneksyną i kalretikuloną, które ułatwiają fałdowanie białek. Prawidłowo sfałdowane białko opuszcza ER, natomiast do białek niepoprawnie sfałdowanych przyłącza się UDP-glukoza (urydyno-5'-difosforan-glukoza). Umożliwia ona ponowną asocjacje z lektynami, kalneksyną oraz kalretikuloną, i pozwala poprawić nieprawidłowo sfałdowaną strukturę białka. Białka są ponownie fałdowane aż do usunięcia trzech lub czterech cząsteczek mannozy (zazwyczaj są to 1-2 cykle). Jeżeli białka nadal są nieprawidłowo sfałdowane, zostają skierowane na drogę degradacji. W usuwaniu mannozy biorą udział między innymi białka EDEM [6].

Równie ważne są enzymy z grupy foldaz np. rodzina izomeraz peptydylodisiarczkowych (PDI). Odgrywają one istotną rolę w procesie fałdowania białek - katalizują wymianę mostków disiarczkowych [11].

Etapy ERAD - retrotranslokacja

Retrotranslokacja, proces przeciwstawny do translokacji, polega na kierowaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu w celu ich degradacji przez proteasom [14].

Peptydy przechodząc przez specjalne kanały translokacyjne zwane retrotranslokonami, ulegają retrotranslokacji zależnej od energii [15]. W procesie uczestniczy białko p97, należące do rodziny białek AAA (ATPazy związane z różnymi czynnościami komórki). Jest heksamerem, zależnym od jonów Mg^{2+} , biorącym udział w degradacji między innymi białek SNARE, (uczestniczących w rozpoznawaniu i fuzji pęcherzyków z błoną komórkową), fuzji homotypowych błon oraz aktywacji czynników transkrypcyjnych związanych z błonami (ang. membrane-bound transcription factor) [16]. ATPaza p97 jest dalej wykorzystywana przez UBX, domenę białową w szlaku ubikwitynacji.

Wciąż nie poznano dokładnej budowy retrotranslokonu, ani sposobu w jaki substraty ERAD są transportowane wzdłuż błony ER w jego pobliżu [15]. Istnieją trzy teorie na temat jego budowy.

Pierwsza z nich zakłada, że kanały tworzone są przez kompleks Sec61. Istnieją dowody, że transport cząsteczek w translokonie Sec61 może odbywać się w obu kierunkach [15].

Druga teoria zakłada wykorzystanie białek z rodziny Derlin (Derlin 1,2,3). Przypuszcza się, że mogą stanowić one elementy jego struktury, lub pełnić funkcje regulujące jego działanie [6]. Derliny są to białka integralne, zawierające domenę o kształcie rombu [15]. Są spokrewnione między innymi z białkiem RHBDL4 – romboidalną proteazą, białkiem transbłonowym, rezydującym na powierzchni ER, pośredniczącym w degradacji różnych białek. Białka Derlin w przeciwieństwie do RHBDL4 nie wykazują aktywności proteolitycznej, więc prawdopodobnie wiążą się z substratem ERAD i kierują go do ligazy E3 w celu ubikwitynacji, a następnie do białka p97 [6].

Trzecia teoria dotyczy wykorzystania specyficznej ligazy E3. Niewątpliwy jest udział ligazy E3 w poliubikwitynacji, jednak duża ilość przezłonowych domen w budowie enzymu powoduje, że może służyć również jako „tunel” dla substratów ERAD [15].

Etapy ERAD - ubikwitynacja

Ubikwityna to niewielkie białko globularne, zbudowane z 76 aminokwasów, o masie 8,6 kD. Może występować w formie wolnej lub związanej. Jest jednym z najbardziej konserwatywnych ewolucyjnie białek. Występuje tylko w komórkach eukariontów [17]. Organizmy prokariotyczne nie posiadają cząsteczek analogicznych pod względem funkcji do ubikwityny. Natomiast białka bakteryjne ThiS i Moad, odpowiadające za wbudowanie siarki do związków organicznych np. kofaktorów tiaminy, mają podobną strukturę do ubikwityny [18]. W skład centrum aktywnego proteiny wchodzi aminokwasy: Leu-Arg-Gly-Gly. W wiązaniu z substratem przeznaczonym do degradacji bierze udział glicyna z 3' końca ubikwityny oraz grupa ϵ -aminowa drugiego białka [17].

Ubikwitynacja jest potranslacyjnym procesem zachodzącym w cytoplazmie lub jądrze komórkowym jako kaskada reakcji [19]. Można wyróżnić dwa rodzaje ubikwitynacji. Monoubikwitynacja, gdy do białka zostają dołączone monomery ubikwityny. Przyłączeniu może podlegać kilka cząsteczek ubikwityny, ale nie może zostać wytworzony z nich łańcuch.

Z kolei poliubikwitynacja polegająca na dołączeniu łańcuchów ubikwityny, w których formowaniu uczestniczą reszty lizynowe znajdujące się w pozycjach 6, 11, 27, 29, 33, 48 i 63 [20].

Pierwszym etapem ubikwitynacji jest aktywacja ubikwityny przez enzym E1. Sekwencja aminokwasowa białka E1 jest wysoce konserwatywna. Delecja genu UBA1 (kodującego enzym E1) u drożdży jest letalna, co podkreśla istotną rolę ubikwitynacji. Białka z rodziny ubikwityny takie jak: ubikwityna, NEDD8, SUMO, APG12, UFM1 oraz ISG15 posiadają własne odpowiedniki enzymu E1. Odkryto również enzym UBE1L2, który potrafi aktywować większość białek z rodziny ubikwityny zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. W czasie aktywacji tworzone jest wysokoenergetyczne wiązanie pomiędzy glicyną obecną na 3' końcu ubikwityny, a obecną w centrum aktywnym enzymu E1 cysteiną [21].

W następnej kolejności aktywnej ubikwityna przenoszona jest na enzym E2 (koniugujący aktywną ubikwitynę). W procesie ERAD funkcję enzymu E2 pełni białko Ubc6p i Ubc7p (kiedy funkcję ligazy spełnia białko Doa10p) oraz Ubc1p i Ubc7p (kiedy funkcję ligazy pełni białko Hrd1p, u ssaków SEL1L) [19].

Kolejnym etapem jest dostarczenie ubikwityny do białka docelowego, które może zachodzić bezpośrednio z udziałem enzymu E2 lub za pomocą enzymu E3 (ligaza ubikwitylowa). Funkcją enzymu jest rozpoznanie substratu ERAD oraz dołączenie do niego łańcucha poliubikwitynowego [17]. U drożdży funkcję enzymu E3 pełni białko Doa10p oraz Hrd1p, są to białka błonowe retikulum endoplazmatycznego, należące do rodziny ligaz RING [19].

W przypadku poliubikwitynacji cały proces jest kilkakrotnie powtarzany, w celu utworzenia łańcucha zbudowanego z czterech lub więcej reszt ubikwityny [17].

Etapy ERAD - degradacja w proteasomach

Ostatnim etapem ERAD jest degradacja białka przy pomocy proteasomu, czyli kompleksu białkowego o cylindrycznym kształcie, złożonego z wielu podjednostek, który wykazuje aktywność enzymatyczną. Peptydy poddane ubikwitynacji, są rozpoznawane przez proteasom 26S zbudowany z rdzenia 20S o aktywności proteolitycznej oraz z dwóch podjednostek o funkcji regulatorowej 19S [2,17]. W transporcie substratu do proteasomu prawdopodobnie bierze udział kompleks białek, obejmujący m.in. białka: BAG6, Ubl4a (białko ubikwityno-podobne 4A), transbłonowe domeny rozpoznające kompleks 35 (T35) oraz SGTA, małe białko tetrapeptydowe, bogate w glutaminę, zawierające powtórzenia, które zapobiegają agregacji substratów ERAD w cytoplazmie [8].

Po umieszczeniu substratu w proteasomie, następuje jego deubikwitynacja, polegająca na odszczepieniu łańcuchów ubikwitylowych. Proces jest zależny od pokładów energii pochodzących z hydrolizy ATP. W tym celu do enzymów deubikwitylujących przyłącza się białko p97 [6]. Odzyskane z łańcuchów cząsteczki ubikwityny, mogą zostać wykorzystane ponownie. Końcowym etapem jest proteoliza białka do oligopeptydów i pojedynczych aminokwasów [17].

Stres retikulum endoplazmatycznego

Stres retikulum endoplazmatycznego jest rodzajem dysfunkcji tego organelum powodowanym przez wiele czynników np.:

- hipoksję czyli niedobór tlenu w komórkach spowodowany zmniejszoną dyfuzją tlenu w płucach lub nieefektywnym transportem tlenu z krwią do tkanek;
- zmniejszenie ilości jonów wapnia w ER. Czynniki odpowiadające za równowagę ilości jonów wapnia takie jak tapsygargina hamują działanie zależnych od ATP kanałów wapniowych w siateczce śródplazmatycznej (ang. sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) [22];
- infekcje wirusowe
- czynniki zaburzające proces glikozylacji białek. Tunikamycyna blokuje N-glikozylację białek. W modelach doświadczalnych zaprojektowanych przez B. Nami i wsp. była stosowana jako induktor odpowiedzi przeciw błędnie sfałdowanym białkom (UPR). Tunikamycyna wytwarzana jest przez bakterie, między innymi: *Streptomyces clavuligerus* i *Streptomyces lysosuperficus* [23].
- czynniki zaburzające transport pęcherzykowy między ER, a aparatem Golgiego; Brefeldyna A (ang. Brefeldin A, BFA), makrocycliczny lakton, substancja wytwarzana z kwasu palmitynowego, jest to toksyna pochodzenia grzybowego, pierwotnie wyizolowana z *Penicillium brefeldianum*. Działanie toksyny powoduje zaburzenie transportu białek pomiędzy ER, a aparatem Golgiego i w rezultacie wydzielane białka trafiają ponownie do ER [24].

Efektom zaburzenia prawidłowej pracy ER na skutek wystąpienia w/w zdarzeń jest nagromadzenie się nieprawidłowo lub całkowicie niesfałdowanych białek w siateczce śródplazmatycznej [2]. W rezultacie komórka aktywuje mechanizm zwany odpowiedzią przeciwstresową retikulum endoplazmatycznego (ang. ER stress response). Uwalniane są białka opiekuńcze ER, czynniki ERAD oraz czynniki hamujące translację, mające na celu zahamować syntezę białek i zmniejszyć obciążenia ER [25].

Nieprawidłowa odpowiedź przeciwstresowa retikulum endoplazmatycznego może być rezultatem: starzenia, mutacji genetycznych oraz czynników środowiskowych i prowadzi do rozwoju różnych chorób, nazywanych chorobami konformacyjnymi. Choroby konformacyjne oraz inne choroby związane ze stresem retikulum endoplazmatycznego to m.in.:

- choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroby ekspansji poliglutaminowych (ang. PolyQ disease), Pelizaeusa-Merzbachera (PMD), choroby prionowe, stwardnienie zanikowe boczne, gangliozydoza typu pierwszego (GM1);
- cukrzyca – wykazano związek między stresem ER, a cukrzycą insulinozależną; na stres ER narażone są komórki β wysp trzustkowych, produkujące duże ilości insuliny;
- miażdżyca – jednym z czynników powodujących miażdżycę jest wysokie stężenie homocysteiny, co wywołuje stres ER;
- niedokrwienie i choroby serca – wykazano związek pomiędzy nadekspresją białek opiekuńczych w trakcie stresu ER, a indukowaną stresem ER apoptozą kardiomiocytów, która prowadzi do przerostu mięśnia sercowego;
- choroby wątroby – spożywanie alkoholu indukuje powstawanie stresu ER, dokładny mechanizm w jakim dochodzi do jego generowania nie został jeszcze poznany;
- choroby nerek – leki przeciwbólowe i przeciwgorączkowe przyczyniają się do uszkodzenia nerek. Jednym z mechanizmów, które wywołują w/w uszkodzenie jest stres ER; aktywacja szlaku PERK przyczynia się do uszkodzenia komórek nabłonka, z którego zbudowany jest kłębuszek.

Odpowiedź przeciwstresowa retikulum endoplazmatycznego, która funkcjonuje prawidłowo pozwala na naprawienie szkód stresu, umożliwia utrzymanie homeostazy oraz chroni narządy przed uszkodzeniem [25].

Odpowiedź przeciw błędnie sfałdowanym białkom (ang. Unfolded Protein Response – UPR)

Mechanizm UPR jest odpowiedzią komórki na stres powiązany z retikulum endoplazmatycznym. Zostaje aktywowany w wyniku akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek na błonie siateczki śródplazmatycznej. Do podstawowych celów UPR należy: przywrócenie homeostazy, zmniejszenie stresu ER oraz uniknięcie efektu cytotoksycznego, który może być spowodowany przez niesprawne rozpoznawanie niesfałdowanych białek, a także przez blokowanie translacji mRNA [26]. UPR wpływa na syntezę białek, na przykład poprzez fosforylację eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (ang. eukaryotic initiation factor 2, eIF2). Fosforylacja eIF2 uniemożliwia rozpoczęcie translacji, powodując rozpad kompleksu

inicjacyjnego. UPR może również oddziaływać na cząsteczki mRNA, powodując ich degradację [27]. Odpowiedź UPR ma na celu przywrócenie równowagi komórkowej, poprzez pobudzenie białek opiekuńczych, biorących udział w procesie ponownego fałdowania. Jeżeli homeostaza i prawidłowa aktywność siateczki śródplazmatycznej nie zostaną przywrócone, UPR kieruje komórkę na drogę apoptozy lub autofagocytozy [26].

Szlaki UPR

Odpowiedź przeciw źle sfałdowanym białkom wykorzystuje trzy szlaki sygnałowe. Początkowym elementem każdego ze szlaków oraz głównym regulatorem UPR jest białko opiekuńcze BiP nazywane również GRP-78 (ang. glucose-regulated protein 78 kDa) lub HSPA5 (ang. heat shock 70kDa protein 5) [26].

BiP (ang. binding immunoglobulin protein), białko opiekuńcze, należy do białek rodziny szoku cieplnego. Wytwarzane jest w komórce pod wpływem bodźców stresowych takich jak: infekcje, substancje chemiczne (m. in. toksyny, metale ciężkie) czynniki fizyczne (promieniowanie UV, wzrost temperatury) oraz wobec wyczerpania składników odżywczych [28, 29]. Zbudowane jest z dwóch domen funkcjonalnych: NBD – wiążącej nukleotyd i SBD – wiążącej substrat. Domena NBD wiąże i hydrolizuje ATP, co jest niezbędne do uwolnienia peptydów związanych z BiP [30,31]. Aktywność BiP jest regulowana przez allosteryczny cykl ATPazy. Przejście ATP w ADP, pod wpływem działania ATPazy powoduje zmianę konformacji BiP, a związanie ATP z podjednostką NBD wywołuje transformację subdomeny SBD α do formy otwartej, charakteryzującej się niskim powinowactwem do substratu. Polipeptydowy substrat zostaje uwolniony z kompleksu z białkiem BiP. Hydroliza ATP skutkuje przejściem subdomeny SBD α do formy zamkniętej, która ponownie wiąże polipeptyd [32]. Na aktywność BiP mają wpływ jego interakcje z innymi białkami w tym: z ko-czaperonami (białkami modelującymi aktywność czaperonów np. ERj1-7); czynnikami wymiany nukleotydów (Sil1, Grp170); innymi czaperonami (kaleksyna, kalretikulina, Grp94, UGGT) i enzymami uczestniczącymi w procesie składania białek (np. disulfidoizomeraza białek/ PDI i cyklofilina B) [33].

Można wyróżnić trzy szlaki UPR: IRE1, PERK i ATF6.

Szlak IRE1

IRE1 to kinaza białkowa serynowo-treoninowa, wykazująca aktywność endonukleazową [34]. W komórkach ssaczyh istnieją dwie formy IRE1, odpowiednio IRE1 α i IRE1 β . IRE1 α jest

formą powszechnie występującą w komórkach, natomiast obecność IRE1 β jest ograniczona do komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego oraz płuc [35,36].

Kinaza IRE1 posiada 3 domeny: N-końcową domenę błonową, która bierze udział w rozpoznawaniu stresu retikulum endoplazmatycznego poprzez detekcję ilości nieprawidłowo sfałdowanych białek; transbłonową domenę (TM) oraz C-końcową domenę efektorową, leżącą poza błoną ER, która posiada aktywność endorybonukleazową (RNazy) [34,35]. Do N-końcowej domeny przyłączone jest białko BiP, które podczas wykrycia stresu ER odłącza się od IRE1, co skutkuje jego aktywacją i umożliwia dimeryzację, trans- autofosforylację i aktywację C-końcowej domeny, która jest w stanie usunąć 26 nukleotydowy fragment (intron) z mRNA czynnika transkrypcyjnego XBP-1 [34,36]. Usunięcie intronu powoduje przesunięcie otwartej ramki odczytu, co w konsekwencji prowadzi do translacji 376 aminokwasowego białka o masie 40kDa [37]. IRE1, biorąc udział w splicingu mRNA, umożliwia powstanie aktywnej formy XBP-1, nazywanej sXBP-1 [38,39]. sXBP-1 reguluje ekspresję genów i ma wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego i odpowiedź komórki na stres [25]. W trakcie stresu retikulum endoplazmatycznego czynnik sXBP-1 jest w stanie zwiększyć syntezę białek opiekuńczych, biorących udział w fałdowaniu białek [38,39].

Dimery cytozolowej domeny IRE-1 α mogą oddziaływać m.in. z cząsteczką TRAF-2 (ang. tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) [26]. Prowadzi to do aktywacji ASK1 (ang. apoptosis signal regulating kinase), kinazy regulującej szlak apoptozy, a następnie do aktywacji kinaz JNK (ang. c-Jun N-terminal kinases), lub p38MAPK (ang. p38 mitogen-activated protein kinase), prowadząc do apoptozy komórki [26,34,35].

Szlak PERK

Nazwa szlaku wywodzi się od kinazy białkowej PERK (ang. protein kinase like endoplasmic reticulum kinase) umiejscowionej na siateczce retikulum endoplazmatycznego. Domena efektorowa PERK jest homologiczna do domen kinaz eukariotycznego czynnika inicjacji translacji, między innymi do domeny katalitycznej kinazy PKR [40]. PERK podobnie jak IRE-1 związana jest z białkiem BiP. Oddysocjowanie białka BiP powoduje dimeryzację i autofosforylację białka PERK, które odpowiada za fosforylację czynnika eIF2. Ufosforylowany eIF2 powoduje zablokowanie translacji oraz aktywuje czynnik ATF4 kodowany przez gen ATF4 [38,39]. Dzięki obecności sekwencji typu IRES (ang. internal ribosome entry site) ATF4 może podlegać translacji, pomimo fosforylacji czynnika eIF2 i regulować ekspresję kluczowych genów

w procesie UPR, między innymi wpływać na syntezę białka CHOP (ang. C/EBP homologous protein), którego nadekspresja indukuje apoptozę [41,42].

Szlak ATF-6

Trzecim ramieniem UPR jest szlak ATF-6. ATF-6 należy do klasy II białek przebłonowych, należących do rodziny bZIP (białka z domeną zamka leucynowego). Do rodziny bZIP należą również wcześniej wymienione białka XBP-1 oraz ATF-4 [33]. ATF-6 posiada dwie izoformy: ATF-6 α i ATF-6 β [26]. Podobnie jak w przypadku IRE-1 i PERK, także do ATF-6 przyłącza się białko BiP. W momencie stresu ER białko BiP odłącza się od ATF-6, a po jego oddysocjowaniu, czynnik ATF-6 przemieszcza się z błony ER do aparatu Golgiego, gdzie dochodzi do proteolitycznej obróbki ATF-6 [43]. Proteazy S1P oraz S2P (ang. site-1, site-2 proteases) hydrolizują wiązania peptydowe prowadząc do powstania ATF-6f [26,44]. Następnie ATF-6f transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się do CRE (ang. ATF/cAMP response element) oraz do ERSE I i II (ang. ER stress response elements). Przyłączenie do ERSE I i II wymaga obecności czynnika jądrowego NF-Y oraz czynnika wiążącego CCAAT (ang. CCAAT binding factor – CBF) [41]. W rezultacie dochodzi do syntezy BiP, CHOP, XBP-1, PDI oraz EDEM1 [26].

Tabela 1. Wpływ wybranych wirusów na szlaki UPR

WIRUS	SZLAK SYGNAŁOWY	SPOSÓB ODDZIAŁYWANIA
Wirus japońskiego zapalenia mózgu – JEV	IRE-1	Wirus aktywuje syntezę proapoptotycznego białka opiekuńczego CHOP. Infekcja powoduje uruchomienie kinazy aktywowanej mitogenami p38MAPK, prowadząc do apoptozy komórki [45].
Wirus zapalenia wątroby typu C, HCV	PERK, IRE-1	Białko E2 wirusa zapalenia wątroby typu C wiąże się do kinazy PERK, przez co blokuje jej aktywność. Dzięki temu wirus wciąż może produkować białka, niezależnie od wystąpienia stresu retikulum endoplazmatycznego. Wirus

		hamuje również szlak IRE-1, przez co może zwiększyć transkrypcję wirusowego RNA [46].
Wirus afrykańskiego pomoru świń – ASFV	PERK, ATF-6	Wirus koduje białko DP71L, homologiczne do białka GADD34, które prowadzi do hamowania syntezy białka CHOP, niezbędnego w indukcji apoptozy [47].
Wirus Epsteina-Barra, EBV	PERK, IRE-1, ATF-6	Wirusowe białko LMP1 aktywuje trzy ramiona UPR. Zwiększa fosforylację eIF2 α , co wpływa na wzrost stężenia ATF4. ATF4 transaktywuje promotor LMP1. LMP1 wpływa na wzrost aktywności kinazy IRE-1. Kinaza IRE-1 powoduje splicing XBP-1. Aktywne białko XBP-1 powoduje wydzielanie immunoglobulin z zakażonych limfocytów B. Wirus również aktywuje czynnik transkrypcyjny ATF-6 [48].
Wirus opryszczki pospolitej typu pierwszego, HSV1	PERK, IRE-1	W trakcie namnażania HSV powstają duże ilości białek kapsydowych, które mogą indukować oraz modyfikować odpowiedź UPR. Wiele białek wirusowych blokuje fosforylację eIF2, co jest kluczowym elementem szlaku PERK [26]. Wirusowe białko US11 hamuje działanie kinaz PKR i PERK. Na szlaku IRE-1 wirus inaktywuje XBP-1 [49].
CHIKV – Arbowirus Chikungunya (alfawirus z rodziny <i>Togaviridae</i>)	PERK	Replikacja wirusa powoduje syntezę białek opiekuńczych retikulum endoplazmatycznego: BiP i HSP-90. We wczesnym stadium infekcji CHIKV silnie hamuje fosforylację eIF2 α , poprzez wirusową polimerazę nsP4 (polimeraza RNA zależna od RNA). Przypuszcza się, że w późnej fazie infekcji

		białka opiekuńcze BiP, HSP-90 współpracują z białkiem EDEM oraz ujemnymi regulatorami fosforylacji eIF2 α tj. p58IPK, GADD34 w celu podtrzymania replikacji CHIKV [50].
SINV (ang. Sindbis Virus)	PERK	Infekcja SINV nie powoduje wzrostu syntezy białek opiekuńczych, jak w przypadku CHIKV. SINV powoduje wzrost fosforylacji eIF2 α i wzmoczoną syntezę białka CHOP prowadząc do wcześniejszego zajścia apoptozy [50].
Cytomegalowirus HCMV	PERK, IRE-1	Wirus aktywuje mechanizm PERK, ale hamuje fosforylację eIF2. Umożliwia aktywację czynnika ATF-4. Wirus wykorzystuje PERK do aktywacji lipogenzy. HCMV zwiększa ekspresję BiP, co ułatwia składanie białek oraz cząsteczek wirionu. Białko wirusowe UL38 zapobiega aktywacji JNK, a białko UL50 hamuje ekspresję białka IRE-1 [51].
SARS-CoV	PERK, ATF-6	Białko 3a SARS-CoV aktywuje szlak PERK, natomiast białko 8ab szlak ATF-6. Przypuszcza się, że białko E koronawirusów może wpływać na szlak IRE-1 [52].

Mechanizm ERAD a cykl infekcyjny wirusów.

Wykorzystanie mechanizmu ERAD przez wirusy na przykładzie wybranych Poliomavirusów

Wirusy należące do poliomavirusów cechują się symetrią ikosaedralną oraz brakiem otoczki lipidowej. Posiadają materiał genetyczny w postaci dwuniciowego DNA przybierającego formę kolistą. Są to małe wirusy, osiągające wielkość ok. 45nm. Poliomawirusy, aby dostać się do wnętrza jądra komórkowego, są transportowane wzdłuż siateczki endoplazmatycznej. Mechanizm ERAD jest niezbędny dla ich efektywnego transportu [53].

Wirus BK (BKPyV), który należy do rodziny poliomawirusów to ludzki patogen, powszechnie występujący w całej populacji. Badania wykazują, że ok. 90% dorosłych zostało zainfekowanych wirusem BK i wirus na stałe wbudował się do ich genomu. Nie jest groźny dla osób zdrowych, natomiast jest niebezpieczny dla osób z obniżoną odpornością. Może być przyczyną chorób takich jak nefropatia lub krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego [54]. Wirus BK by dostać się do komórki, musi związać się z receptorami gangliozydu GT1b oraz GD1b. Kolejnym etapem jest transport wirusa do siateczki ER zachodzący z wykorzystaniem mikrotubul. Wirus w celu przedostania się z siateczki do jądra komórkowego wykorzystuje proteasom oraz szlak ERAD. Na powierzchni siateczki pozbywa się części kapsydu, tylko w ten sposób może później ulec replikacji i transkrypcji. Kapsyd BKPyV zbudowany jest z trzech białek: VP1, VP2 i VP3. Białko VP1 tworzy zewnętrzną powłokę maskującą białka VP2 i VP3 przed wykryciem przez przeciwciała. Wirus wykorzystuje enzymy gospodarza, reduktazę i izomerazę disiarczową (PDI), w celu odłączenia białka VP1 poprzez hydrolizę wiązań disiarczowych. Przypuszcza się, że proteasom odgrywa ważną rolę we wczesnym etapie infekcji, ponieważ do 18 godziny od rozpoczęcia infekcji, pacjenta można skutecznie leczyć epoksymycyną, która jest wysoce selektywnym inhibitorem proteasomu [54,55]. Białka ERAD, między innymi kaleksyna i BiP, oddziałują z wirusem, indukując rozpad kapsydu oraz przemieszczenie wirusa do cytozolu.

Wirus SV40 (ang. simian virus) jest to małpi wirus należący do rodziny poliomawirusów. Od ponad 50 lat trwają badania weryfikujące czy wirus SV40 może atakować ludzkie komórki i być przyczyną nowotworzenia. Dotychczas, pomimo wielu prób, nie potwierdzono jednoznacznie możliwości infekowania ludzkich komórek [56]. Wirus koduje antygen T, który łącząc się z białkiem p53, inaktywuje jego działanie. Białko p53 jest silnym supresorem nowotworowym, zdolnym do indukcji apoptozy [53].

SV-40 wiąże się z cząsteczką gangliozydu GM1, jest to specyficzne wiązanie do reszt kwasu sialowego [8]. Po związaniu się z receptorem wirus zaczyna formować polimery wykorzystując białko – kaweolinę-1. Jednak w większości przypadków tworzy tratwy lipidowe, dzięki którym przemieszcza się do siateczki ER [57]. Podobnie jak w przypadku wirusa BK, SV-40 musi pozbyć się białka VP1 kapsydu, w celu dalszej infekcji komórki. Demontaż kapsydu jest zależny od stężenia jonów wapnia. Podczas tego etapu, podobnie jak w przypadku innych poliomawirusów, uczestniczą enzymy gospodarza oraz białka opiekuńcze. Są to między innymi

PDI i trzy tiodisulfidowe oksydoreduktazy (ang. thiol-disulphide oxidoreductases) ERp57, ERp29, ERp72. Warto dodać, że inhibicja PDI powoduje gromadzenie się cząsteczek wirusa na błonie ER, czego skutkiem jest również inaktywacja procesu ERAD, oraz utrata przepuszczalności błony ER dla większości substancji [58,59,60]. Białka VP2 i VP3, które nie są już osłonięte białkiem VP1, tworzą hydrofobową powłokę, dzięki czemu wirus może przenikać przez błonę ER. Jest podatny również na tworzenie agregatów z innymi cząsteczkami wirionów. Aby tego uniknąć wirus wykorzystuje białko BiP. Zasada wiązania z BiP jest identyczna jak w szlakach UPR. Dalszym etapem zakażenia jest przejście wirusa z ER do cytoplazmy, w tym celu cząsteczka wirusa musi uwolnić białko BiP [8]. Do efektywnego transportu z ER do cytoplazmy Poliomawirusy wykorzystują błonowe kanały retrotranslokacyjne [58,59,60].

Wykorzystanie mechanizmu ERAD przez wirusy na przykładzie wybranych Herpeswirusów

Wirusy należące do rodziny Herpeswirusów posiadają także budowę ikosaedralną, ale materiał genetyczny jest w postaci liniowej, podwójnej nici DNA. W odróżnieniu od Poliomawirusów, Herpeswirusy mają też otoczkę lipidową. Jednym z przedstawicieli tej rodziny jest ludzki herpesvirus typu 5 - cytomegalowirus (CMV/HCMV), wywołujący cytomegalię, objawiającą się złym samopoczuciem, bólem mięśni i gorączką. Szczególnie niebezpieczny dla osób z obniżoną odpornością oraz dla kobiet w ciąży. Cytomegalowirus należy do najczęściej przenoszonych wirusów na płód. Skutkiem może być śmierć płodu [6,51,61].

Herpeswirusy, wykorzystują mechanizm ERAD do degradacji cząsteczek MHC klasy I, za pomocą białek US2 i US11. Wirusowe transbłonowe glikoproteiny US11 i US2 wiążą się do nowo zsyntetyzowanych cząsteczek MHC klasy I [6]. US2 w celu przemieszczenia MHC-I korzysta z SPP (ang. signal peptide protease). Prawdopodobnie przyłączenie do SPP umożliwia US2 modulowanie własnej aktywności oraz struktury. Natomiast US11 zamiast SPP wymaga białka Derlin-1. Błonowa domena US11 wiąże się z błonową domeną łańcucha ciężkiego MHC-I. US11 przekazuje MHC-I białku Derlin-1, które kieruje cząsteczkę MHC-I do degradacji przez proteasom [62].

W prawidłowym procesie białko TAP (ang. transporter associated with antigen processing), transportuje zsyntetyzowane cząsteczki MHC-I z cytoplazmy do siateczki śródplazmatycznej, z której poprzez Aparat Golgiego przenoszone są na powierzchnię błony komórkowej. Herpeswirusy degradując cząsteczkę MHC-I, zapobiegają prezentacji antygenów

limfocytom T cytotoksycznym. Ma to za zadanie ochronić komórkę zakażoną HCMV przed odpowiedzią układu immunologicznego [63].

Wykorzystanie mechanizmu ERAD przez wirusy na przykładzie wybranych rethrowirusów

HIV-1 (ang. human immunodeficiency virus) należy do rodziny rethrowirusów. Wirus posiada otoczkę lipidową oraz przybiera formę kolistą. Otoczką zawiera charakterystyczne białka – dla HIV-1 są to między innymi gp120 i gp41. Materiał genetyczny występuje w formie pojedynczej nici RNA. Charakterystyczne enzymy dla wirusa to: odwrotna transkryptaza pozwalająca na przepisanie informacji genetycznej z RNA na DNA oraz integraza umożliwiająca połączenie materiału genetycznego wirusa z DNA gospodarza. Wirus atakuje komórki zawierające antygen CD4, głównie limfocyty T pomocnicze i powoduje zespół nabytego niedoboru odporności AIDS (ang. Acquired Immune Deficiency Syndrome), charakteryzujący się dramatycznym spadkiem liczby limfocytów T_H [63].

Wirus HIV-1 wykorzystuje mechanizm ERAD w celu zmniejszenia ilości antygenu CD4 na powierzchni zakażonych komórek [6]. CD4 jest głównym receptorem dla HIV-1, stanowi dla cząsteczki wirusa „wrota” do zakażenia. Do tej pory nie poznano powodu, dla którego HIV-1 wywołuje obniżenie ekspresji powierzchniowej CD4 [64]. Prawdopodobnie zapobiega to infekcji wielokrotnej [65]. Superinfekcja mogłaby spowodować nagromadzenie się wirusowego materiału genetycznego w zainfekowanych komórkach gospodarza, co zmniejszyłoby częstość rekombinacji HIV-1. Według innej hipotezy, wirus obniża ilość cząsteczek CD4 zmniejszając w ten sposób wypadkową odpowiedź układu immunologicznego [64].

Wirusowe białko Env bierze udział w transporcie glikoproteiny CD4 z powierzchni zaatakowanej komórki do retikulum endoplazmatycznego. Z kolei za proces degradacji CD4 odpowiedzialne jest białko Vpu (występuje w podtypie HIV-1), promujące syntezę białek i składanie cząstek wirusa oraz uwolnienie wirionów potomnych z komórki gospodarza. Vpu wiąże się z cytoplazmatyczną częścią CD4 w siateczce śródplazmatycznej. Ważną rolę odgrywa koreceptor komórkowy β -TrCR, którego zadaniem jest rozpoznawanie receptora SCF ^{β -TrCP} dla ligazy E3. Koreceptor β -TrCR wpływa na wiązanie Vpu-CD4, oddziałując na białko Vpu poprzez fosforylację. Jest to niezbędny etap podczas degradacji CD4. Blokowanie miejsc fosforylacji Vpu, pozwala na zahamowanie procesu degradacji CD4 [66].

HIV-1 wykorzystuje podobny mechanizm do degradacji teteryny (białka BST-2). BST-2 jest białkiem komórkowym syntetyzowanym pod wpływem interferonu α , działa, jako antagonistą Vpu oraz wpływa na infekcję wirusową hamując uwalnianie wirusów potomnych z komórki [67].

Wykorzystanie mechanizmu ERAD przez wirusy na przykładzie wybranych Hepadnawirusów

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV, ang. hepatitis B) z rodziny Hepadnaviridae, wykazuje powinowactwo do hepatocytów. Zakażenie HBV wywołuje ostre i przewlekłe zapalenie wątroby (WZW typu B). W rezultacie infekcja może prowadzić do marskości wątroby i zwykle śmiertelnego raka wątrobowokomórkowego [68].

Cząsteczki wirusa zawierają materiał genetyczny w formie podwójnej, kolistej nici DNA, z czego jedna nić jest niekompletna (od 10 do 50%). Posiadają zewnętrzną otoczkę lipidową oraz wewnętrzny rdzeń białkowy [69]. Otoczką zewnętrzną zbudowaną z trzech glikoprotein: małej S, średniej M oraz dużej L, których geny pochodzą z jednej otwartej ramki odczytu. Białka S i L mogą być wydzielane w formie N-glikozylowanej, lub nieglikozylowanej, natomiast białko M zawsze podlega glikozylacji (pojedynczej lub podwójnej). Polipeptydy z białek otoczki prezentowane są jako antygeny przez cząsteczki MHC-I. Na przebieg zakażenia prawdopodobnie ma wpływ rozpoznawanie antygenów przez limfocyty T CD8. Kluczową rolę w degradacji białek otoczki odgrywa ubikwityna. Ubikwitynowane białka podlegają degradacji przez proteasom. W ten sposób powstają odcinki polipeptydowe, które prezentowane są efektywnie przez MHC-I, jako antygeny. Białka S i M mają niewiele miejsc do których może przyłączyć się ubikwityna, przez co ubikwitynacja nie jest koniecznym etapem do ich degradacji. W przypadku infekcji HBV nie dochodzi jednak do powstania fragmentów polipeptydowych mogących pełnić funkcje epitopów prezentowanych na powierzchni komórki przez cząsteczki MHC klasy I. Wirus HBV, aby zapobiec uczuleniu antygenowemu limfocytów T_c wykorzystuje mechanizm ERAD, a dokładniej modyfikację szlaku ERAD, w którym nie dochodzi do ubikwitynacji, ale zachodzi degradacja przez proteasom. W szlaku tym uczestniczą białka EDEM, które rozpoznają białka wirusowe i kierują je na drogę degradacji. Podczas degradacji zależnej od proteasomu z białka M otoczki wirusa, powstają fragmenty ok. 8 nukleotydowe, które cząsteczki MHC kl. I wykorzystują jako antygeny. Dla białek niepoddawanych ubikwitynacji zachodzi całkowita degradacja do pojedynczych aminokwasów lub cząsteczek

krótszych niż 8 nukleotydów. W związku z czym takie fragmenty nie mogą być prezentowane przez cząsteczki MHC kl. I [70].

Podsumowanie

Badania nad sposobem w jaki wirusy wykorzystują ERAD mogą pomóc zrozumieć molekularny mechanizm infekowania komórek. Zdobyta w ten sposób wiedzę można by wykorzystać podczas projektowania nowych leków przeciwwirusowych. Inhibitory proteasomu, m.in. epoksymycyna oraz Eeyarestatin I, wykazują skuteczność w zwalczaniu początkowego stadium infekcji poliomawirusów np. u pacjentów zakażonych BKV [6]. Stosowanie epoksymycyny sprawdza się także w leczeniu zakażenia HBV. W trakcie 16 godzinowego leczenia epoksymycyną wzrasta stężenie nieglikozylowanej formy białka M [70]. Monitorowano również wpływ Eeyarestatin I oraz 5-NA (5-nitrofuryl-akroleiny) na poziom degradacji cząsteczki MHC I przez cytomegalowirusa. Po zadziałaniu substancji na komórki zakażone wirusem cytomegalii, widoczny był wzrost ilości cząsteczek MHC I na powierzchni komórek [71].

Substancje hamujące działanie proteasomu stosowane są w trakcie terapii przeciwnowotworowej, między innymi w leczeniu szpiczaka mnogiego wykorzystuje się inhibitor proteasomu, Bortezomib. Jest to dipeptydowy związek, analog kwasu borowego [72]. Główne działanie bortezomibu opiera się na blokowaniu aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu. W przypadku komórek nowotworowych lek prowadzi do apoptozy, podczas gdy w zdrowych komórkach przyczynia się jedynie do zahamowania cyklu komórkowego [73]. Nie zbadano dotychczas działania tego preparatu na komórki zakażone przez wirusy.

Podsumowując, mechanizm ERAD w cyklu infekcyjnym wirusów ma istotne znaczenie w przebiegu zakażenia. Należy dalej badać możliwość wykorzystywania ERAD przez inne rodzaje wirusów. Warto również monitorować skuteczność inhibitorów proteasomu jako potencjalnych leków w walce z chorobami wirusowymi.

Wnioski

- Wirusy efektywnie wykorzystują mechanizm ERAD w trakcie swojego cyklu infekcyjnego, głównie w celu obrony przed rozpoznaniem przez układ immunologiczny gospodarza
- Mechanizm ERAD pełni ważną rolę w komórkach, a zaburzenia w jego działaniu prowadzą do poważnych, często nieuleczalnych chorób

- Znane są środki blokujące działanie ERAD np. poprzez inhibicję proteasomu, jednak nie są powszechnie stosowane w terapiach przeciwwirusowych
- Wiedza na temat mechanizmu ERAD może być istotna do projektowania nowych leków

References

1. English AR, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(4): a013227
2. Jheng JR, Ho JY, Horng JT. ER stress, autophagy, and RNA viruses. *Front Microbiol.* 2014; 5: 388 - 411.
3. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 2002; 32(5-6):235-49.
4. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum." *EMBO Rep* 2002; 3(10): 944-950.
5. Tsai YC, Weissman AM. Ubiquitylation in ERAD: reversing to go forward? *PLoS Biol.* 2011; 9(3): e1001038.
6. Byun H, Gou Y, Zook A. et al. ERAD and how viruses exploit it. *Front Microbiol.* 2014; 5: 330-345.
7. Vashist S, Ng DT. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol.* 2004; 165(1): 41-52.
8. Dupzyk A, Tsai B. How Polyomaviruses Exploit the ERAD Machinery to Cause Infection. *Viruses.* 2016; 8(9): 242-256.
9. Lee MJ, Lee JH, Rubinsztein DC. Tau degradation: The ubiquitin–proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Prog Neurobiol.* 2013; 105: 49-59.
10. Römisch K. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci.* 1999; 112: 4185-4191.
11. Nakatsukasa K, Brodsky JL. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic.* 2008; 9: 861-870.
12. Van den Boomen DJ, Lehner PJ. Identifying the ERAD ubiquitin E3 ligases for viral and cellular targeting of MHC class I. *Mol Immunol.* 2015; 68(2): 106-111.
13. Słomińska-Wojewódzka M. Specyficzność substratowa białek opiekuńczych retikulum endoplazmatycznego EDEM1 i EDEM2 oraz ich rola w transporcie wewnątrzkomórkowym rycyny. Uniwersytet Gdański 2015.
14. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(4): 246-255.

15. Frabutt DA, Zheng YH. Arms Race between Enveloped Viruses and the Host ERAD Machinery. *Viruses*. 2016; 8: 255-276.
16. Madsen L, Seeger M, Semple CA. et al. New ATPase regulators—p97 goes to the PUB." *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41(12): 2380–2388.
17. Grzelakowska-Sztabert B. Zależna od ubikwiny degradacja białek. *Kosmos*. 2005; 54: 133-148.
18. Grzelakowska-Sztabert B. Zależna od ubikwiny degradacja białek. *Kosmos*. 2005; 54: 133-148.
19. Lemus LV, Goder V. Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin. *Cells*. 2014; 3: 824-847.
20. Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR. et al. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life*. 2012; 64(2): 136-142.
21. Pelzer C, Kassner I, Matentzoglou K. et al. UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin." *J Biol Chem*. 2007; 282: 23010-23014.
22. Rogers TB, Inesi G, Wade R. et al. Use of Thapsigargin to Study Ca²⁺ Homeostasis in Cardiac Cells. *Bioscience* 1995; 15: 341-349.
23. Nami B, Donmez H, Kocak N. Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44⁺/CD24⁻ phenotype breast cancer stem cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2016; 68(7): 419– 426.
24. Turlej E. Współczesne metody detekcji cytokin – real time PCR, ELISPOT oraz technika wewnątrzkomórkowego barwienia cytokin. *Postepy Hig Med Dosw*. 2009; 63: 213-224.
25. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J*. 2007; 274: 630-658.
26. Sen D, Balakrishnan B, Jayandharan GR. Cellular unfolded protein response against viruses used in gene therapy. *Front Microbiol*. 2014; 5: 250-265.
27. Bartoszewski R, Brewer JW, Rab A et al. The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBP1) induces microRNA-346 expression that targets the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes. *J Biol Chem*. 2011; 286: 41862-41870.
28. Ma Y, Hendershot LM. The Unfolding Tale of the Unfolded Protein Response. *Cell*. 2001; 107: 827-830.

29. Kuch M. Białko szoku cieplnego - czy mamy już do czynienia z nowym markerem niedokrwienia? *Kardiologia Polska*. 2009; 67: 953-954.
30. Yang J, Nune M, Zong Y. et al. Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure*. 2015; 23: 2191-2203.
31. Mayer M, Kies U, Kammermeier R. et al. BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J Biol Chem*. 2000; 275: 29421-29425.
32. Wang J, Lee J, Liem D, Ping P. HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. *Gene*. 2017; 618: 14-23.
33. Zimmermann R, Blatch GL. A novel twist to protein secretion in eukaryotes." *Trends Parasitol*. 2009; 25: 147-150.
34. Urano F, Bertolotti A, Ron D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000; 113: 3697 -3702.
35. Jiang D, Niwa M, Koong AC. Targeting the IRE1alpha-XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. *Semin Cancer Biol*. 2015; 33: 48-56.
36. Martino MB, Jones L, Brighton B. et al. The ER stress transducer IRE1beta is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol*. 2013; 6: 639-654.
37. Kober L, Zehe Ch, Bode J. Development of a novel ER stress based selection system for the isolation of highly productive clones. *Biotechnol Bioeng*. 2012; 109 (10): 2599–2611.
38. Hollien, J. and Weissman, J.S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*. 313 (2006) 104-107.
39. Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. and Weissman, J.S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*. 186 (2009) 323-331.
40. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol Cell*. 2000; 5(5): 897 - 904.
41. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74: 739-789.
42. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." *J Clin Invest*. 2005; 115: 2656-2664.
43. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008; 3: 399-425.

44. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T et al. ATF6 Is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *Cell*. 2008; 33: 75-89.
45. Su HL, Liao CL, Lin YL. Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Unfolded Protein Response. *J Virol*. 2002; 76(9): 4162-4171.
46. Tardif KD, Mori K, Kaufman RJ. et al. Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2004; 279 (17): 17158-17164.
47. Galindo I, Hernaez B, Munoz-Moreno R. et al. The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection. *Cell Death Dis*. 2012; 3: 341-351.
48. Lee DY, Sugden B. The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood*. 2008; 111: 2280-2289.
49. Burnett HF, Audas TE, Liang G. et al. Herpes simplex virus-1 disarms the unfolded protein response in the early stages of infection. *Cell Stress Chaperones*. 2012; 17(4): 473-483.
50. Rathore APS, Ng ML, Vasudevan SG. Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2 α phosphorylation. *Virol J*. 2013; 10: 36.
51. Stahl S, Burkhart JM, Hinte F. et al. Cytomegalovirus downregulates IRE1 to repress the unfolded protein response." *PLoS Pathog*. 2013; 9 (8): e1003544.
52. Fung TS, Liu DX. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Front Microbiol*. 2014; 5: 296-309.
53. Fay N, Pante N. Nuclear entry of DNA viruses. *Front Microbiol*. 2015; 6: 467-486.
54. Bennett SM, Jiang M, Imperiale MJ. Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. *J Virol*. 2013; 87: 8843-8852.
55. Maliński M, Cichocki M. Inhibicja aktywności proteasomu jako nowa strategia w terapii i chemioprewencji nowotworów. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013; 67: 90-106.
56. Poulin DL, DeCaprio JA. Is there a role for SV40 in human cancer? *J Clin Oncol*. 2006; 24: 4356-4365.
57. Konopska B, Gołąb K, Gburek J. Endocytoza niezależna od klatryny - rola w patomechanizmie chorób i aspekty farmaceutyczne. *Postepy Hig Med Dosw*. 2015; 69: 763-776.

58. Walczak, C. P. & Tsai, B. A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *J. Virol.* 85, 2386- 2396 (2011).
59. Magnuson, B. et al. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol. Cell* 20, 289-300 (2005).
60. Geiger, R. et al. BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nat. Cell Biol.* (2011). 94. Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B. & Imperiale, M. J. Early events during BK virus entry and disassembly. *J. Virol.* 83, 1350-1358 (2009).
61. Lee R, Nair M. Diagnosis and treatment of herpes simplex 1 virus infection in pregnancy. *Obstet Med.* 2017; 10(2): 58-60.
62. Loureiro J, Lilley BN, Spooner E. et al. Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature.* 2006; 441: 894-897.
63. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia.* Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN 2012, wyd. 6.
64. Wildum S, Schindler M, Munch J. et al. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol.* 2006; 80: 8047-8059.
65. Morito D, Nagata K. Pathogenic Hijacking of ER-Associated Degradation: Is ERAD Flexible? *Mol Cell.* 2015; 59: 335-344.
66. Roy N, Pacini G, Berlioz-Torrent C. et al. Mechanisms underlying HIV-1 Vpu-mediated viral egress. *Front Microbiol.* 2014; 5: 177 - 184.
67. Gładysz A, Knysz B. *Diagnostyka, profilaktyka, klinika i terapia zakażeń HIV/AIDS – współczesne możliwości i problemy.* Wrocław, Wydawnictwo Continuo 2009.
68. Lazar C, Macovei A, Petrescu S. et al. Activation of ERAD pathway by human hepatitis B virus modulates viral and subviral particle production." *PLoS One.* 2012; 7: 34169-34179.
69. Virella G. *Mikrobiologia i choroby zakaźne.* Wrocław, Urban & Partner, 2000.
70. Liu Y, Testa JS, Philip R. A Ubiquitin Independent Degradation Pathway Utilized by a Hepatitis B Virus Envelope Protein to Limit Antigen Presentation. *PLoS One.* 2011; 6: 24477–24487.

71. Wang Q, Shinkre BA, Lee JG. et al. The ERAD inhibitor Eeyarestatin I is a bifunctional compound with a membrane-binding domain and a p97/VCP inhibitory group. *PLoS One*. 2010; 5(11): e15479.
72. Shah JJ, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*, 2009; 23: 1964-1979.
73. Bonvini P, Zorzi E, Basso G. et al. Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30+ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21: 838-842.