

Received: 09.01.2017
Accepted: 12.10.2017
Published: 05.05.2018

RNaza MCPIP1 jako istotny regulator wewnątrzkomórkowej puli RNA*

MCPIP1 – an important RNase controlling intracellular RNA pool

Natalia Pydyn, Katarzyna Miękus, Jerzy Kotlinowski

Zakład Biochemii Ogólnej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

Potranskrypcyjna regulacja puli mRNA jest podstawowym procesem koordynującym prawidłowe funkcjonowanie komórek. Właściwa liczba cząsteczek RNA w komórkach, pozwala im na szybką adaptację w odpowiedzi na zmieniające się warunki otoczenia bez konieczności aktywacji translacji. Jednym z procesów istotnych w utrzymaniu homeostazy RNA jest precyzyjnie regulowana szybkość jego degradacji.

Białkiem zaangażowanym w ten proces jest RNaza MCPIP1, której funkcja została opisana w 2009 roku. Białko to, w swojej strukturze zawiera domenę palca cynkowego odpowiedzialną za wiązanie RNA oraz domenę katalityczną, która bierze udział w endonukleolitycznym trawieniu cząsteczek RNA. Substratami MCPIP1 są zarówno endogenne mRNA, miRNA, jak i RNA wirusów. Choć nie jest jeszcze znana struktura MCPIP1, wiadomo jak zbudowane jest centrum aktywne tego enzymu, oraz jakie motywy w sekwencji RNA są rozpoznawane i trawione - MCPIP1 tnie RNA w obrębie struktury spinki. Szerokie spektrum substratów MCPIP1 powoduje, że białko to jest zaangażowane w regulację wielu procesów biologicznych, takich jak m. in. regulacja stanu zapalnego, różnicowanie komórek, rozwój nowotworów czy infekcje wirusowe. W niniejszym artykule podsumowano najważniejsze odkrycia dotyczące funkcji białka MCPIP1.

Słowa kluczowe:

MCPIP1 • RNaza • RNA • regulacja potranskrypcyjna • stan zapalny

Summary

Post-transcriptional regulation of mRNA pool is a key process coordinating the proper functioning of cells. This tight control of RNA molecules allows cells to quickly adapt to environmental conditions without the activation of translation. Degradation of RNA is one of the important mechanisms regulating RNA homeostasis.

One of the protein involved in this process is a RNase called MCPIP1, whose function was described in 2009. The enzymatic activity of MCPIP1 is tightly linked to the zinc finger domain responsible for RNA binding and a catalytic domain that participates in endonucleolytic digestion of RNA molecules. MCPIP1 recognizes and cleaves a wide array of substrates, both endogenous mRNA, miRNA, and RNA viruses. Although MCPIP1 structure has not yet been resolved, it is known how an active center is formed and what motives in the RNA sequence are recognized and digested. MCPIP1 recognizes and cleaves RNA within the hairpin structure.

*Druk artykułu sfinansowano z grantów Sonata przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki (JK nr 2015/19/D/NZ5/00254 oraz KM nr 2013/09/D/NZ5/00249).

Keywords:

Broad spectrum of MCP1 substrates makes this protein an important regulator of many biological processes such as inflammation, cell differentiation, tumor growth or viral infections. In this review we describe a structure, properties and biological function of RNase called MCP1.

MCP1 • RNase • RNA • post-transcriptional regulation • inflammation

GICID 01.3001.0011.8255
DOI: 10.5604/01.3001.0011.8255
Word count: 4551
Tables: 2
Figures: 3
References: 45

Adres autora:

dr Jerzy Kotlinowski, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; e-mail: j.kotlinowski@uj.edu.pl

ODKRYCIE BIAŁKA MCP1

Białko MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1, alias Regnase-1) opisano po raz pierwszy w 2006 r. Gen *ZC3H12A*, który je koduje jest umiejscowiony na chromosomie 1 (1p34.3) i składa się z 6 eksonów oraz intronów. Długość ludzkiego genu *ZC3H12A* wynosi 9860 par zasad, natomiast powstałe na matrycy mRNA białko – MCP1 jest zbudowane z 599 aminokwasów (ryc. 1) [44]. Nazwa MCP1 nawiązuje do obserwacji dokonanej przez Zhou i wsp., którzy stwierdzili, że ekspresja genu *ZC3H12A* ulega indukcji w ludzkich monocytach stymulowanych chemokiną MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) [44]. Późniejsze badania wykazały także wzrost jego ekspresji po stymulacji komórek IL-1 β , TNF, czy też LPS [17, 29, 34]. Stwierdzono również, że poziom ekspresji *ZC3H12A* jest zróżnicowany zarówno w tkankach ludzkich jak i mysich. W komórkach ludzkich, najwyższy poziom mRNA MCP1 wykryto w leukocytach, choć ulega on także ekspresji m.in. w sercu, śledzionie, wątrobie, łożysku oraz w płucach [29]. Podobne wyniki zaobserwowano w mysich tkankach – produkt genu *Zc3h12a* wykryto w śledzionie, grasicy, płucach i jelitach [16].

BUDOWA I FUNKCJE MCP1

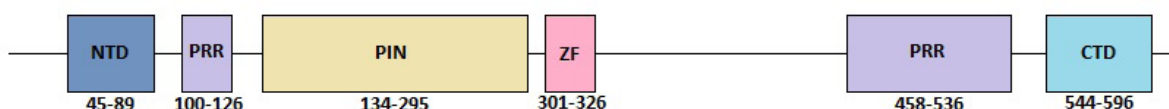
Białko MCP1 należy do rodziny białek MCP, reprezentowanych przez MCP1, 2, 3 i 4 (kodowanych przez geny *ZC3H12A*, *B*, *C* i *D* u ludzi oraz *Zc3h12a*, *b*, *c* i *d* u myszy). Ich cechą charakterystyczną jest występowanie motywu pojedynczego palca cynkowego typu

CCCH oraz domeny PIN (PiLT N-terminus domain) [17]. Obecność palca cynkowego w strukturze MCP1 jest związana z jego aktywnością rybonukleolityczną, choć początkowo przypisywano mu funkcje czynnika transkrypcyjnego [17,44]. Dzięki badaniom *in silico* oraz danym eksperymentalnym wkrótce wykazano, że białko MCP1 ma aktywność RNazy. Aktywność ta wiąże się z występowaniem w jego strukturze N-końcowego fragmentu wykazującego homologię do tzw. domeny PIN, która jest cechą charakterystyczną białek o właściwościach RNazy [26,29].

Mimo że nie jest znana struktura przestrzenna całego białka, badania *in silico* oraz analiza czterech domen pozwoliły na wyróżnienie kilku regionów w obrębie MCP1 (ryc. 1):

- Domena N-terminalna (NTD, N-terminal domain), która składa się z aminokwasów 45-89 [42].
- Regiony bogate w prolinę (PRR, proline-rich regions) zbudowane z aminokwasów 100-126 oraz 458-536 [44].
- Domena typu PIN (PiLT N-terminus domain), aminokwasy 133-270 [12], 139-297 [39], 134-295 [42].
- Motyw pojedynczego palca cynkowego (ZF) typu CCCH (CCCH-type zinc-finger domain), aminokwasy 306-322 [16] 305-325 [12], 300-324 [39].
- Domena C-terminalna (CTD, C-terminal domain), która składa się z aminokwasów 545-598 [16,12], 544-596 [42].

W strukturze MCP1 domena PIN poprzedza motyw palca cynkowego, a co istotne, tworzy centrum aktywne, którego strukturę przestrzenną opisano w 2012 r. [41].



Ryc. 1. Schemat budowy białka MCP1. Zaznaczono domeny: NTD (N-terminal domain), PRR (proline-rich regions), PIN (PiLT N-terminus domain), palec cynkowy ZF (CCCH-type zinc-finger domain) oraz CTD (C-terminal domain). Szczegółowy opis w tekście, na podstawie [42], zmieniono

W obrębie domeny PIN występuje ujemnie naładowana kieszeń składająca się z reszt kwasów asparaginyowych (Asp; 141, 225, 226, 244 i 248) oraz reszty asparaginowej (Asn; 144). Aminokwasy te biorą udział w wiązaniu atomów Mg^{2+} oraz odpowiadają za aktywność katalityczną białka. Eksperymenty z wykorzystaniem mutagenyzy punktowej pozwoliły stwierdzić, że RNazowa aktywność białka, zależna od wiązania jonów Mg^{2+} , jest związana z występowaniem aminokwasów w pozycjach 141, 225, 226 oraz 244 [29, 41]. Usunięcie domeny PIN ze struktury białka lub wykorzystanie postaci zmutowanej (m.in. Asp141Ala, Asp225Ala lub Asp226Ala) zniżyło aktywność RNazową tego białka [29, 26, 41]. Warto podkreślić, że mechanizm działania MCP1P1 jest związany z rozpoznawaniem przez to białko struktury spinki do włosów występującej w RNA, która jest następnie cięta. W najnowszych badaniach opisano, że białko MCP1P1 może oddziaływać ze spinkami o różnej wielkości i różnej sekwencji nukleotydów, m.in. 6-3-6 (6 nukleotydów tworzy trzon, natomiast 3 tworzą pętle, ryc. 2A) [28]. Mimo poznania struktury domeny PIN nie wiadomo w dalszym ciągu jaki jest mechanizm rozpoznawania i wiązania struktury RNA przeznaczonej do degradacji. Wiadomo natomiast, że MCP1P1 bierze udział w degradacji transkryptów podlegających translacji z udziałem białka UPF1 [28]. Niedawno opublikowane wyniki wykazały, że aktywność katalityczna mysiego białka *Mcpip1* jest regulowana przez wzajemne oddziaływania między jego domenami. Oddziaływanie między domenami NTD i PIN w obrębie jednej cząsteczki jest kluczowe dla prawidłowej aktywności enzymatycznej białka. Ponadto, domeny PIN dwóch monomerów oddziałują tworząc funkcjonalny dimer [42].

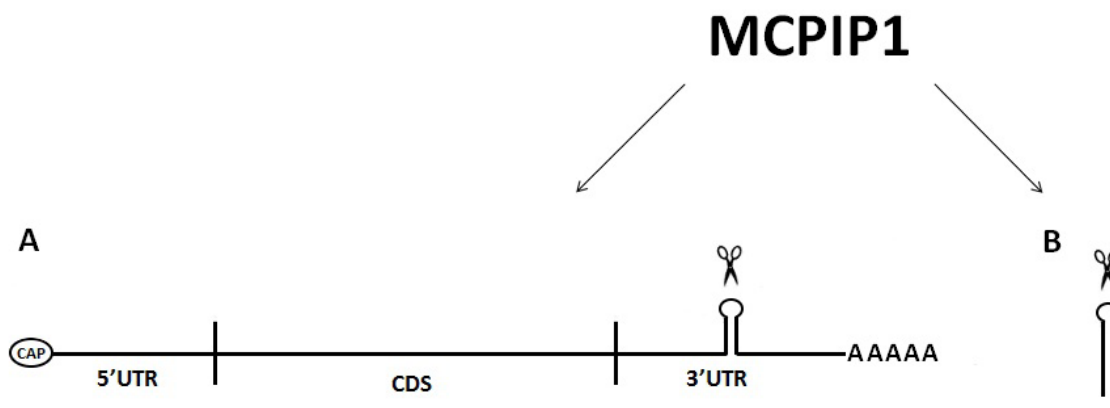
Oprócz mRNA substratami dla MCP1P1 mogą być również inne cząsteczki kwasów nukleinowych. Jak wykazały badania, MCP1P1 hamuje biogenezę miRNA przez cięcie nukleolityczne w obrębie sekwencji nukleotydowej umiejscowionej w pętli terminalnej pre-miRNA tym samym

zmniejszając liczbę dojrzałych cząsteczek miRNA (ryc. 2B) [35]. Egzogenny RNA, taki jak materiał genetyczny wirusów np. HIV, HCV jest również degradowany dzięki endonukleolitycznej aktywności MCP1P1 [20, 21, 24].

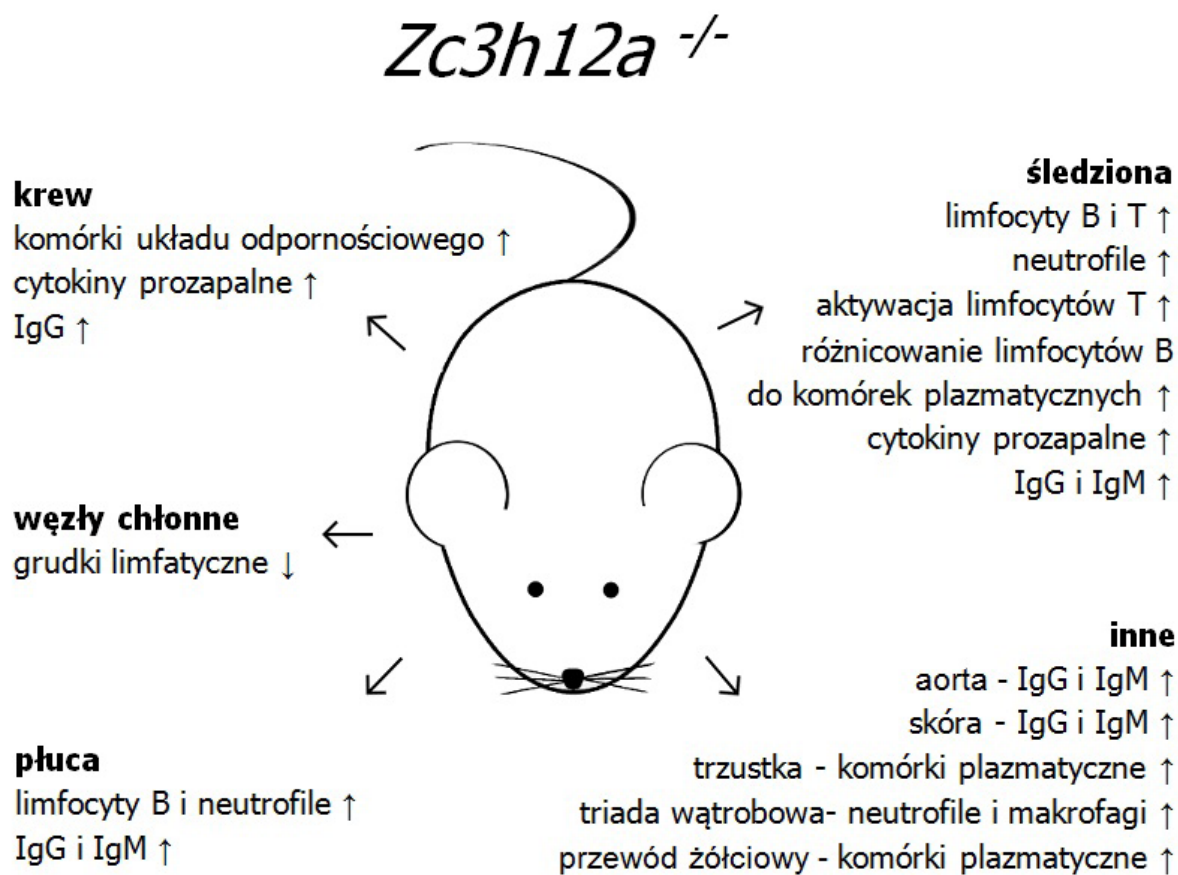
Aktywność endonukleolityczna MCP1P1 jest bardzo dobrze udokumentowana i nie budzi obecnie żadnych wątpliwości. Drugim procesem, w którym uczestniczy MCP1P1 jest deubikwitynacja białek [16, 40]. Liang i wsp. wykazali, że nadekspresja MCP1P1 w makrofagach hodowanych *in vitro* zmniejsza wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak TNF, IL-1 β czy IL-6. Autorzy stwierdzili, że MCP1P1 bierze udział w deubikwitynacji TRAF2, TRAF3 i TRAF6. Usuwanie reszty ubikwityny z białek TRAF zmniejszało aktywację NF- κ B i kinazy JNK [16]. Być może białko MCP1P1 nie ma aktywności deubikwitynazy *per se*, ale funkcjonuje w kompleksie z białkami TANK oraz deubikwitynazą USP10. Naukowcy opisali występowanie kompleksu TANK-MCP1P1-USP10, którego aktywność powoduje usuwanie reszt ubikwityny z białek TRAF6 i hamuje aktywację NF- κ B [40]. Taki pośredni mechanizm działania MCP1P1 wydaje się bardziej prawdopodobny, ponieważ białko to nie zawiera domeny homologicznej do poznanych dotąd deubikwitynaz. Co więcej, nie opisano do tej pory żadnego białka mającego dwie aktywności enzymatyczne: RNazy i deubikwitynazy [38].

KONSEKWENCJE DELEKCJI GENU *ZC3H12A* *IN VIVO*

Wrodzona odpowiedź immunologiczna jest aktywowana przez stymulację receptorów rozpoznających molekularne wzorce patogenności (PAMP, pathogen associated molecular patterns). PAMP to charakterystyczne struktury drobnoustrojów, takie jak m.in. lipopolisacharyd, RNA wirusów, niemetylowane sekwencje CpG, które są selektywnie rozpoznawane przez komórki układu immunologicznego. Związanie PAMP przez receptor wyzwała kaskadę zdarzeń mających na celu eliminację patogenu



Ryc. 2. Mechanizm działania białka MCP1P1. MCP1P1 jest endonukleazą, która trawi pętle RNA występujące w charakterystycznym motywie spinki do włosów. Rozpoznawane struktury trawiane przez MCP1P1 znajdują się w mRNA (A) lub miRNA (B). MCP1P1 trawi również wirusowe RNA



Ryc. 3. Charakterystyka myszy pozbawionych białka Mcpip1. Zwierzęta pozbawione funkcjonalnych kopii genu *Zc3h12a* (*Zc3h12a*^{-/-}) kodującego białko Mcpip1 wykazują szereg nieprawidłowości związanych z ogólnoustrojową reakcją zapalną. Charakteryzuje je m.in. podwyższone stężenie immunoglobulin oraz cytokin prozapalnych w osoczu czy też powiększona śledziona zawierająca zwiększoną liczbę leukocytów

i przywrócenie homeostazy organizmu. W celu identyfikacji genów, których ekspresja wzrasta w przebiegu tego typu odpowiedzi odpornościowej, mysie makrofagi stymulowano za pomocą lipopolisacharydu, który jest rozpoznawany przez receptory Toll-like typu 4 (TLR4). Stwierdzono, iż zwiększonej ekspresji ulega 214 genów, a wśród nich znajduje się gen *Zc3h12a* kodujący Mcpip1. W celu określenia roli tego białka w przebiegu odpowiedzi immunologicznej analizie poddano myszy pozbawione genu *Zc3h12a*. Zwierzęta wykazały liczne nieprawidłowości w rozwoju – m.in. zaburzenia wzrostu, powiększenie węzłów chłonnych oraz śledziony. We krwi badanych myszy wykryto zwiększoną liczbę komórek odpornościowych oraz immunoglobulin. Zaobserwowano także naciek komórek plazmatycznych do płuc, trzustki oraz przewodu żółciowego (ryc. 3) [26].

Inne szczegółowe badania wykazały, iż u ośmiotygodniowych myszy pozbawionych genu *Zc3h12a* doszło do znaczących zaburzeń rozwoju narządów limfatycznych: grasicy, węzłów chłonnych oraz śledziony. W grasicy nie rozwinęła się kora, a rdzeń był znacznie powiększony, natomiast w korze węzłów chłonnych nie występowały grudki limfatyczne. W śledzionie doszło do rozro-

stu miazgi czerwonej oraz niedorozwoju miazgi białej, zaobserwowano także obniżoną liczbę limfocytów B i T, podwyższoną liczbę neutrofilów, nadmierną aktywację limfocytów T oraz zwiększone różnicowanie limfocytów B do komórek plazmatycznych. Wykryto infiltrację limfocytów B i makrofagów do płuc oraz neutrofilów i makrofagów w okolicy triady wątrobowej, a także akumulację przeciwciał klasy IgM oraz IgG w skórze, płucach, aorcie i śledzionie. Ogólnoustrojowy stan zapalny zaobserwowany u tych zwierząt był związany również ze znacząco podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych zarówno w osoczu, jak i w śledzionie badanych zwierząt [27]. W wyniku tych zaburzeń doszło do śmierci 90% badanych zwierząt w ciągu 12 tygodni od urodzenia [26,27]. Dzięki uzyskanym wynikom stwierdzono, iż MCPIP1 jest ważnym regulatorem stanu zapalnego, a jego brak przyczynia się do rozwoju poważnych zaburzeń immunologicznych. Podobny fenotyp wykazały myszy pozbawione receptora LDL, którym przeszczepiono szpik kostny od myszy pozbawionych genu *Zc3h12a*. Model ten wykorzystano do badania rozwoju miażdżycy u zwierząt karmionych paszą eksperymentalną typu „western diet”, która jest wzbogacona w nasycone kwasy tłuszczowe, cukry proste oraz cholesterol, co

odzwierciedla skład pokarmu spożywanego powszechnie przez przedstawicieli społeczeństw zachodnich. Myszy wykazały zaburzenia wzrostu, anemię, powiększenie węzłów chłonnych i śledziony, dezorganizację grasicy, infiltrację komórek układu odpornościowego do wątroby, trzustki i nerek oraz zaburzenia różnicowania i dojrzewania komórek hematopoetycznych. Co zaskakujące, u zwierząt tych poziom cholesterolu w osoczu był niższy, a zmiany miażdżycowe były mniejsze, niż u zwierząt kontrolnych [43]. W kolejnych badaniach wykazano, iż u myszy z delecją genu *Zc3h12a* stymulacja receptorów TLR4 za pomocą lipopolisacharydu wywołała szok septyczny, a śmierć wszystkich badanych zwierząt nastąpiła w ciągu 72 godzin od stymulacji. Bezpośrednią przyczyną śmierci był najprawdopodobniej zespół ostrej niewydolności oddechowej [6].

Stan zapalny, związany z lokalnie podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych, aktywacją mikrogleju, astrocytów oraz limfocytów jest zjawiskiem towarzyszącym niedokrwinnemu udarowi mózgu. U myszy, u których wywołano taki udar, zaobserwowano wzrost poziomu *Mcpip1* w mózgu. Wykazano również, iż podanie lipopolisacharydu przed wywołaniem udaru, ma prewencyjne działanie neuroprotekcyjne, za pośrednictwem *Mcpip1*. Natomiast u zwierząt pozbawionych genu *Zc3h12a* nie zaobserwowano tego – zwierzęta te charakteryzował podwyższony poziom cytokin prozapalnych, zwiększony obrzęk mózgu oraz wyższa śmiertelność [18]. Podobnie, zastosowanie elektroakupunktury lub stosowanie minocykliny przed wywołaniem udaru mózgu działało neuroprotekcyjnie za pośrednictwem *Mcpip1* [10,11].

Brak *Mcpip1* u myszy wywołuje także autoimmunologiczne zapalenie błony śluzowej żołądka, przez co dochodzi do zmniejszonej absorpcji żelaza i witaminy B12, a w konsekwencji do zaburzeń erytropoezy i rozwoju niedokrwistości złośliwej. U zwierząt tych zaobserwowano obecność autoprzeciwciał skierowanych przeciwko erytrocytom, które przyczyniają się do usuwania tych krwinek z krążenia [45].

Liczne zaburzenia rozwoju zwierząt pozbawionych genu *Zc3h12a* oraz ich duża śmiertelność po kilkunastu tygodniach od urodzenia znacząco utrudnia prowadzenie badań *in vivo*. Trudności te skłoniły badaczy do sięgnięcia po nowatorskie rozwiązanie – swoiste tkankowo usunięcie genu *Zc3h12a* u zwierząt modelowych, a następnie badanie wybranych procesów. Dzięki takiej swoistej komórkowo delecji *Zc3h12a* w limfocytach T, określono rolę *Mcpip1* w zapobieganiu ich nadmiernej aktywacji. U myszy tych zaobserwowano zwiększoną liczbę limfocytów T efektorowych oraz pamięci w obrębie śledziony, co było skutkiem podwyższonego tempa proliferacji oraz zwiększonej ekspresji genów związanych z ich aktywacją, kodujących molekuły powierzchniowe oraz cytokiny prozapalne [39]. Natomiast podczas badań dotyczących roli *Mcpip1* w przebiegu łuszczycy, wykorzystano myszy mające tylko jeden prawidłowy allel genu *Zc3h12a*. Myszy heterozygotyczne charakteryzował cięższy przebieg choroby niż

myszy typu dzikiego: w zwiększonym stopniu obserwowano u nich złuszczenie skóry, zgrubienie naskórka, parakeratozę oraz naciek neutrofilów do skóry [30].

DEGRADACJA MRNA PRZEZ MCPIP1

Najdokładniej opisaną aktywnością MCPIP1 jest endonukleolityczna degradacja swoistych transkryptów biorących udział w różnorodnych procesach komórkowych. Jedne z pierwszych badań dotyczących funkcji MCPIP1 wykazały, iż białko to degraduje mRNA IL-6, IL-12p40 oraz receptora kalcytoniny (tabela 1) [26]. Następnie wykryto podobny mechanizm w regulacji mRNA IL-1 β , a także w autoregulacji własnego transkryptu przez MCPIP1 [7,29]. Cytokina, której mRNA jest degradowane przez MCPIP1 jest IL-2, odgrywająca ważną rolę w aktywacji i proliferacji limfocytów T. Doświadczenia prowadzone z użyciem limfocytów T pomocniczych wykazały, iż w czasie ich aktywacji dochodzi do indukcji ekspresji MCPIP1. Białko MCPIP1 wiąże się do transkryptu IL-2, a następnie prowadzi do jego degradacji, co potwierdzono badając komórki z nadekspresją MCPIP1 [15]. *Mcpip1* destabilizuje także transkrypt kodujący białko powierzchniowe Ox40 oraz podjednostki c-Rel czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, które są zaangażowane w aktywację limfocytów T [39]. Poziom transkryptów białek, które również pełnią rolę w aktywacji limfocytów T, takich jak *Icos*, *Cd44* oraz *Tnfr2* jest prawdopodobnie regulowany bezpośrednio przez *Mcpip1* [39]. W podobny sposób *Mcpip1* hamuje różnicowanie limfocytów Th17 – przez wpływ na poziom transkryptów *Ikb ζ* , *Ikbns* oraz *Irf4*, które są zaangażowane w ten proces [8]. Powyższe wyniki pozwalają na wysnucie wniosku, iż MCPIP1 odgrywa rolę w zapobieganiu nadmiernej aktywacji limfocytów T.

MCPIP1 jest również zaangażowany w negatywną regulację zależnego od IL-17 przekazu sygnału przez degradację mRNA receptorów tej cytokiny (IL-17RA i IL-17RC) [4]. Badania wykazały, że MCPIP1 odpowiada także za kontrolę fizjologicznej oraz poinfekcyjnej ekspresji genu kodującego IL-8 w komórkach epitelialnych, w wyniku bezpośredniej degradacji mRNA tej chemokiny. Ponieważ jest ona czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilów, MCPIP1 hamuje zależną od IL-8 infiltrację tych komórek i odpowiedź zapalną [3].

RNazowa aktywność MCPIP1 odgrywa także rolę w procesie różnicowania różnego typu komórek. Ekspresja *Zc3h12a* wzrasta w czasie różnicowania mysich fibroblastów linii 3T3-L1 do adipocytów. Nasz zespół wykazał, iż wzmożona ekspresja MCPIP1 w preadipocytach poddanych różnicowaniu, hamuje ten proces, bowiem wpływa na obniżenie poziomu transkryptu C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein beta), jednego z induktorów adipogenezy [22]. Najnowsze wyniki wskazują na bezpośrednie trawienie tego mRNA przez MCPIP1, zidentyfikowano także kilka potencjalnych struktur typu „spinki do włosów” w 3'UTR transkryptu C/EBP β , z którymi MCPIP1 może wchodzić w interakcję (tabela 2) [23]. *Mcpip1* promuje natomiast

Tabela 1. Zestawienie poznanych do tej pory substratów MCPIP1

TYP RNA	SUBSTRAT	PROCES
mRNA	IL-6, IL-12p40 [26] IL-1 β [29] IL-17RA, IL-17RC [4] IL-8 [3]	inicjacja reakcji zapalnej
	IL-2 [15] Ox40, c-Rel [39]	aktywacja i proliferacja limfocytów T
	CTR [26]	regulacja gospodarki wapniowej
	I κ B ζ , I κ BNS, IRF4 [8]	różnicowanie limfocytów Th17
	MCPIP1 [7] COX2 [2, 28] MAfK, ID, CXCL1, CXCL2, CXCL3 [28] IER3 [14]	stan zapalny
	C/EBP β [22, 23]	różnicowanie preadipocytów
	TET1, TET2, TET3 [9]	różnicowanie progenitorowych komórek nerwowych
	BCL2L1, BCL2A1, BIRC3, RelB, BCL3 [25] BCL2 [2]	apoptoza
	HIF2 α [19]	procesy nowotworowe
	let-7g, miR16-1, miR-135b, miR-21, miR-143, miR-145 [35]	choroby serca, choroby nowotworowe, rozwój serca, stan zapalny
miRNA	miR-20b, miR-34a [33]	angiogeneza
	miR-126, miR-199a [31]	stan zapalny i pozawałowa przebudowa serca
	miR-146a [35, 32, 31]	utrzymanie tolerancji immunologicznej, stan zapalny i pozawałowa przebudowa serca
	miR-155 [35, 31, 13]	stan zapalny i pozawałowa przebudowa serca, polaryzacja fenotypu makrofagów
	miR-125 [13]	polaryzacja fenotypu makrofagów
	miR-3613-3p [1]	procesy nowotworowe
	KSHV: miR-1, miR-2, miR-3, miR-7, miR-8, miR-10a, miR-12 [5]	infekcja wirusowa
wirusowe RNA	JEV, DEN [20] HIV [24] HCV [21]	infekcja wirusowa

różnicowanie mysich progenitorowych komórek nerwowych kory mózgowej do neuronów, za pośrednictwem degradacji transkryptów białek Tet1, Tet2 oraz Tet3, które są zaangażowane w demetylację DNA [9].

Rola MCPIP1 w biologii nowotworów wydaje się równie znacząca. W tkance nowotworowej piersi, poziom MCPIP1 jest niższy niż w zdrowej tkance. Podobną zależność zaobserwowano porównując komórki linii komórkowej raka piersi z prawidłowymi komórkami epitelialnymi gruczołu piersiowego. Nadekspresja MCPIP1 wpływała na zwiększoną apoptozę komórek przez degradację transkryptów kodujących białka antyapoptotyczne, takie jak BCL2L1, BCL2A1, BIRC3, RelB, i BCL3. Podobne działanie wywołuje nadekspresja MCPIP1 w komórkach nowotworowych *in vivo* – wpływa na regresję nowotworu i redukcję przerzutów [25]. Również w raku nerki typu jasnokomórkowego, poziom MCPIP1 jest niższy w tkance nowotworowej niż

w zdrowej tkance. Wzmocniona ekspresja MCPIP1 w komórkach Caki-1 (linii komórkowej jasnokomórkowego raka nerki) zmniejsza ich proliferację oraz wpływa na indukcję apoptozy. W przypadku tego nowotworu, MCPIP1 ma wpływ na zmniejszony poziom białka HIF2 α , które jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym ekspresję genów związanych z procesami nowotworowymi [19]. Co ciekawe, w większości degradowanych transkryptów MCPIP1 wiąże struktury typu „spinki do włosów” w obrębie 3'UTR tych mRNA (tabela 2). Wyjątkiem są transkrypty białek Tet1, Tet2 i Tet3 oraz IL-17RA, do których MCPIP1 wiąże się w obrębie sekwencji kodujących.

MCPIP1 HAMUJE BIOGENEZĘ MIRNA

Do grupy jednoniciowych cząsteczek kwasów nukleinowych, których stabilność jest regulowana przez MCPIP1 zalicza się także miRNA. MCPIP1 hamuje ich bioge-

Tabela 2. Proponowane sekwencje tworzące struktury typu „spinki do włosów” w 3'UTR wybranych transkryptów, rozpoznawane przez białko MCPIP1 [23,28].

SUBSTRAT	SEKWENCJA SPINKI (TRZON-PĘTLA-TRZON)
IL-6	GUUCUC-UAC-GAGAAC
IkB ζ	UUGUUUC-UAU-GAAACAA CACUAU-UAU-AUAGUG
C/EBP β	CGGGG-GAG-CCCCG GGGC-TCCC-GCCC

nezę przez cięcie nukleolityczne w obrębie sekwencji nukleotydowej umiejscowionej w pętli terminalnej prekursorowego miRNA. MCPIP1 działa w ten sposób antagonistycznie w stosunku do białka Dicer, które pełni ważną funkcję w procesie dojrzewania miRNA. Odkrywczy tego mechanizmu wykazali, iż MCPIP1 hamuje biogenezę let-7g, miR-16-1, miR-135b, miR-146a, miR-21, miR-155, miR-143 oraz miR-145 (tabela 1) [35]. Roy i wsp. wykazali, że w przebiegu procesów zapalnych MCPIP1 degrдуje antyangiogenne pre-miRNA, takie jak pre-miR-20b oraz pre-miR-34a. Funkcją tych miRNA jest represja translacji białka HIF1 α oraz SIRT1, które wzmacniają potencjał angiogeny np. komórek linii HUVEC [33].

MiR-146a zapobiega również rozwojowi chorób autoimmunologicznych poprzez hamowanie biosyntezy białek TRAF-6, IRAK-1, IFN-5, STAT-1, a więc interferonów typu I [36,37]. Białka te pełnią istotne funkcje w przypadku tocznia rumieniowatego układowego, gdzie poziom interferonów typu I w leukocytach jest wysoki, natomiast miR146a niski. Wykazano, iż pod wpływem interferonów typu I poziom MCPIP1 wzrasta, wpływając na zahamowanie biogenezy miR-146a. Gdy poziom tego miRNA jest zmniejszony, dochodzi do obniżenia tolerancji immunologicznej oraz rozwoju chorób autoimmunologicznych [32].

Mcpip1, m.in. przez degradację miRNA, odgrywa także rolę w polaryzacji fenotypu makrofagów. Stwierdzono bowiem, że IL-4 za pośrednictwem Mcpip1 indukuje polaryzację makrofagów do fenotypu alternatywnie aktywowanego (M2). Poziom miR-155 i miR-125, które są związane z polaryzacją makrofagów w kierunku fenotypu aktywowanego klasycznie (M1), jest zmniejszony w komórkach wykazujących nadekspresję Mcpip1, przyczyniając się do preferencyjnej polaryzacji makrofagów do fenotypu M2, który wiąże się z odpowiedzią antyzapalną [13]. Hamowanie biogenezy miRNA przez MCPIP1 odgrywa również rolę w procesach nowotworowych. Nadekspresja MCPIP1 w komórkach linii nerwiaka zarodkowego ma wpływ na zmniejszony poziom miR-3613-3p, a także na podwyższony poziom białek regulowanych przez ten miRNA (DFFB, APAF1) [1].

MCPIP1 DEGRADUJE WIRUSOWE RNA

Substratem dla MCPIP1 jest także genomowy RNA wirusów. Pierwsze odkrycia wykazały, iż MCPIP1 jest negatywnym regulatorem replikacji dwóch wirusów: japońskiego zapalenia mózgu (JEV) oraz dengi (DEN). Oba wirusy są zaliczane do rodziny *Flaviviridae*, a ich

materiał genetyczny jest zbudowany z jednoniciowej cząsteczki RNA o dodatniej polarności. Poziom MCPIP1 w komórkach linii A549 rośnie pod wpływem infekcji tymi flawiwirusami. Jak wykazano, do hamowania ich replikacji dochodzi w wyniku bezpośredniej degradacji RNA przez MCPIP1 [20]. U osób zarażonych wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), obserwuje się podwyższony poziom MCPIP1 w komórkach wątroby. Podobnie jak DEN i JEV, HCV zaliczany jest do rodziny *Flaviviridae* i zawiera materiał genetyczny w postaci jednoniciowego RNA o dodatniej polarności. MCPIP1 tak jak w przypadku wyżej wymienionych wirusów degrдуje wirusowe RNA i hamuje replikację HCV [21]. MCPIP1 hamuje również namnażanie innych wirusów mających ten typ materiału genetycznego – wirusa Sindbis, wirusa alfa oraz wirusów zapalenia mózgu i mięśnia sercowego. Do podobnej regulacji dochodzi w niektórych wirusach mających materiał genetyczny w postaci jednoniciowego RNA o ujemnej polarności – wirusa grypy typu A oraz ortomyksowirusa. MCPIP1 hamuje także replikację adenowirusów, których materiał genetyczny jest zbudowany z DNA [20]. Wirus zespołu nabytego braku odporności (HIV) zawierający materiał genetyczny w postaci jednoniciowego RNA o dodatniej polarności, atakuje limfocyty T pomocnicze, a także makrofagi i komórki dendrytyczne. Jego cechą jest zdolność do integracji swego materiału genetycznego do genomu zaatakowanych komórek. Również w tym przypadku wykazano, że MCPIP1 hamuje replikację wirusa HIV w limfocytach T pomocniczych, najprawdopodobniej w wyniku nukleolitycznego cięcia RNA po jego transkrypcji z DNA gospodarza [24].

PODSUMOWANIE

Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów jest istotnym czynnikiem wpływającym na homeostazę zarówno komórek prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Jeden z głównych mechanizmów jest związany z kontrolowaniem stabilności mRNA. Mechanizm ten pozwala na szybką adaptację komórek do panujących warunków bez konieczności aktywacji transkrypcji. Dzięki degradacji mRNA, zmniejsza się ilość nowo syntetyzowanego białka. Właściwa rotacja puli mRNA, konieczna do utrzymania prawidłowej homeostazy komórek, jest regulowana m.in. przez degradację transkryptów w wyniku nukleolitycznego trawienia. Jak ważne są to procesy, wykazały badania opisujące fenotyp zwierząt pozbawionych funkcjonalnego genu *Zc3h12a*, który koduje RNazę Mcpip1. Białko Mcpip1 przez degradację mRNA cytokin prozapalnych jest zaangażowane m.in. w negatywną

regulację stanu zapalnego. U myszy pozbawionych Mcp1 stwierdzono ogólnoustrojową reakcję zapalną, prowadzącą do śmierci zwierząt.

Kilkuletnie badania białka MCP1 sugerują, że może być ono potencjalnym celem terapeutycznym w zwalczaniu ludzkich chorób zapalnych. Związki chemiczne, które hamują degradację MCP1 mogłyby być terapeu-

tycznie użyteczne w przewlekłym zapaleniu lub chorobach autoimmunologicznych. Być może małe cząsteczki hamujące częściowo aktywność MCP1 zwiększyłyby aktywację układu immunologicznego, pomocną w terapii nowotworowej. Jednak w dalszym ciągu wiele ważnych pytań dotyczących właściwości MCP1 wymaga dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Boratyn E., Nowak I., Horwacik I., Durbas M., Mistarz A., Kukla M., Kaczówka P., Łastowska M., Jura J., Rokita H.: Monocyte Chemoattractant Protein-Induced Protein 1 Overexpression Modulates Transcriptome, Including MicroRNA, in Human Neuroblastoma Cells. *J. Cell. Biochem.*, 2016; 117: 694-707
- [2] Bugara B., Konieczny P., Wolnicka-Głubisz A., Eckhart L., Fischer H., Skalniak L., Borowczyk-Michalowska J., Drukala J., Jura J.: MCP1 contributes to the inflammatory response of UVB-treated keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, 2017
- [3] Dobosz E., Wilamowski M., Lech M., Bugara B., Jura J., Potempa J., Koziel J.: MCP1-1, Alias Regnase-1, Controls Epithelial Inflammation by Posttranscriptional Regulation of IL-8 Production. *J. Innate Immun.*, 2016; 8: 564-578
- [4] Garg A.V., Amatya N., Chen K., Cruz J.A., Grover P., Whibley N., Conti H.R., Hernandez Mir G., Sirakova T., Childs E.C., Smithgall T.E., Biswas P.S., Kolls J.K., McGeachy M.J., Kolattukudy P.E., i wsp.: MCP1 Endoribonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation. *Immunity*, 2015; 43: 475-487
- [5] Happel C., Ramalingam D., Ziegelbauer J.M.: Virus-Mediated Alterations in miRNA Factors and Degradation of Viral miRNAs by MCP1. *PLoS Biol.*, 2016; 14: e2000998;
- [6] Huang S., Miao R., Zhou Z., Wang T., Liu J., Liu G., Chen Y.E., Xin H.B., Zhang J., Fu M.: MCP1 negatively regulates toll-like receptor 4 signaling and protects mice from LPS-induced septic shock. *Cell. Signal.*, 2013; 25: 1228-1234;
- [7] Iwasaki T., Takeuchi O., Teraguchi S., Matsushita K., Uehata T., Kuniyoshi K., Satoh T., Saitoh T., Matsushita M., Standley D.M., Akira S.: The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. *Nat. Immunol.*, 2011; 12: 1167-1175;
- [8] Jeltsch K.M., Hu D., Brenner S., Zöller J., Heinz G.A., Nagel D., Vogel K.U., Rehage N., Warth S.C., Edelmann S.L., Gloury R., Martin N., Lohs C., Lech M., Stehlein J.E., i wsp.: Cleavage of roquin and regnase-1 by the paracaspase MALT1 releases their cooperatively repressed targets to promote T(H)17 differentiation. *Nat. Immunol.*, 2014; 15: 1079-1089;
- [9] Jiang H., Lv X., Lei X., Yang Y., Yang X., Jiao J.: Immune Regulator MCP1 Modulates TET Expression during Early Neocortical Development. *Stem Cell Reports*, 2016; 7: 439-453;
- [10] Jin Z., Liang J., Wang J., Kolattukudy P.E.: Delayed brain ischemia tolerance induced by electroacupuncture pretreatment is mediated via MCP-induced protein 1. *J. Neuroinflammation.*, 2013; 10: 63;
- [11] Jin Z., Liang J., Wang J., Kolattukudy P.E.: MCP-induced protein 1 mediates the minocycline-induced neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury *in vitro* and *in vivo*. *J. Neuroinflammation.*, 2015; 12: 39;
- [12] Jura J., Skalniak L., Koj A.: Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1 (MCP1) is a novel multifunctional modulator of inflammatory reactions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012; 1823: 1905-1913;
- [13] Kapoor N., Niu J., Saad Y., Kumar S., Sirakova T., Becerra E., Li X., Kolattukudy P.E.: Transcription factors STAT6 and KLF4 implement macrophage polarization via the dual catalytic powers of MCP1. *J. Immunol.*, 2015; 194: 6011-6023;
- [14] Kochan J., Wawro M., Kasza A.: IF-combined smRNA FISH reveals interaction of MCP1 protein with IER3 mRNA. *Biol. Open.*, 2016; 5: 889-898;
- [15] Li M., Cao W., Liu H., Zhang W., Liu X., Cai Z., Guo J., Wang X., Hui Z., Zhang H., Wang J., Wang L.: MCP1 down-regulates IL-2 expression through an ARE-independent pathway. *PLoS One*, 2012; 7: e49841;
- [16] Liang J., Saad Y., Lei T., Wang T., Qi D., Yang Q., Kolattukudy P.E., Fu M.: MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF- κ B signaling. *J. Exp. Med.*, 2010; 207: 2959-2973;
- [17] Liang J., Wang J., Azfer A., Song W., Tromp G., Kolattukudy P.E., Fu M.: A novel CCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 6337-6346;
- [18] Liang J., Wang J., Saad Y., Warble L., Becerra E., Kolattukudy P.E.: Participation of MCP-induced protein 1 in lipopolysaccharide preconditioning-induced ischemic stroke tolerance by regulating the expression of proinflammatory cytokines. *J. Neuroinflammation.*, 2011; 8: 182;
- [19] Ligeza J., Marona P., Gach N., Lipert B., Miekus K., Wilk W., Jaszczynski J., Stelmach A., Loboda A., Dulak J., Branicki W., Rys J., Jura J.: MCP1 contributes to clear cell renal cell carcinomas development. *Angiogenesis*, 2017;
- [20] Lin R.J., Chien H.L., Lin S.Y., Chang B.L., Yu H.P., Tang W.C., Lin Y.L.: MCP1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: 3314-3326;
- [21] Lin R.J., Chu J.S., Chien H.L., Tseng C.H., Ko P.C., Mei Y.Y., Tang W.C., Kao Y.T., Cheng K.Y., Liang Y.C., Lin S.Y.: MCP1 suppresses hepatitis C virus replication and negatively regulates virus-induced proinflammatory cytokine responses. *J. Immunol.*, 2014; 193: 4159-4168;
- [22] Lipert B., Wegrzyn P., Sell H., Eckel J., Winiarski M., Budzynski A., Matlok M., Kotlinowski J., Ramage L., Malecki M., Wilk W., Mitus J., Jura J.: Monocyte chemoattractant protein-induced protein 1 impairs adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1843: 780-788;
- [23] Lipert B., Wilamowski M., Gorecki A., Jura J.: MCP1, alias Regnase-1 binds and cleaves mRNA of C/EBP β . *PLoS One*, 2017; 12: e0174381;
- [24] Liu S., Qiu C., Miao R., Zhou J., Lee A., Liu B., Lester S.N., Fu W., Zhu L., Zhang L., Xu J., Fan D., Li K., Fu M., Wang T.: MCP1 restricts HIV infection and is rapidly degraded in activated CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 19083-19088;
- [25] Lu W., Ning H., Gu L., Peng H., Wang Q., Hou R., Fu M., Hoft D.E., Liu J.: MCP1 selectively Destabilizes Transcripts Associated with an Antiapoptotic Gene Expression Program in Breast Cancer Cells That Can Elicit Complete Tumor Regression. *Cancer Res.*, 2016; 76: 1429-1440;
- [26] Matsushita K., Takeuchi O., Standley D.M., Kumagai Y., Kawagoe T., Miyake T., Satoh T., Kato H., Tsujimura T., Nakamura H., Akira S.: Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*, 2009; 458: 1185-1190;

- [27] Miao R., Huang S., Zhou Z., Quinn T., Van Treeck B., Nayyar T., Dim D., Jiang Z., Papasian C.J., Eugene Chen Y., Liu G., Fu M.: Targeted disruption of MCP1/Zc3h12a results in fatal inflammatory disease. *Immunol. Cell Biol.*, 2013; 91: 368-376;
- [28] Mino T., Murakawa Y., Fukao A., Vandenbon A., Wessels H.H., Ori D., Uehata T., Tartey S., Akira S., Suzuki Y., Vinuesa C.G., Ohler U., Standley D.M., Landthaler M., Fujiwara T., Takeuchi O.: Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell*, 2015; 161: 1058-1073;
- [29] Mizgalska D., Węgrzyn P., Murzyn K., Kasza A., Koj A., Jura J., Jarzab B., Jura J.: Interleukin-1-inducible MCP1 protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1 β mRNA. *FEBS J.*, 2009; 276: 7386-7399;
- [30] Monin L., Gudjonsson J.E., Childs E.E., Amatya N., Xing X., Verma A.H., Coleman B.M., Garg A.V., Killeen M., Mathers A., Ward N.L., Gaffen S.L.: MCP1/Regnase-1 Restricts IL-17A- and IL-17C-Dependent Skin Inflammation. *J. Immunol.*, 2017; 198: 767-775;
- [31] Niu J., Jin Z., Kim H., Kolattukudy P.E.: MCP-1-induced protein attenuates post-infarct cardiac remodeling and dysfunction through mitigating NF- κ B activation and suppressing inflammation-associated microRNA expression. *Basic Res. Cardiol.*, 2015; 110: 26;
- [32] Qu B., Cao J., Zhang F., Cui H., Teng J., Li J., Liu Z., Morehouse C., Jallal B., Tang Y., Guo Q., Yao Y., Shen N.: Type I Interferon Inhibition of MicroRNA-146a Maturation Through Up-Regulation of Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein 1 in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, 2015; 67: 3209-3218;
- [33] Roy A., Zhang M., Saad Y., Kolattukudy P.E.: Antidicer RNase activity of monocyte chemotactic protein-induced protein-1 is critical for inducing angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2013; 305: C1021-C1032;
- [34] Skalniak L., Mizgalska D., Zarebski A., Wyrzykowska P., Koj A., Jura J.: Regulatory feedback loop between NF- κ B and MCP-1-induced protein 1 RNase. *FEBS J.*, 2009; 276: 5892-5905;
- [35] Suzuki H.I., Arase M., Matsuyama H., Choi Y.L., Ueno T., Mano H., Sugimoto K., Miyazono K.: MCP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. *Mol. Cell*, 2011; 44: 424-436;
- [36] Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., Baltimore D.: NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 12481-12486;
- [37] Tang Y., Luo X., Cui H., Ni X., Yuan M., Guo Y., Huang X., Zhou H., de Vries N., Tak P.P., Chen S., Shen N.: MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.*, 2009; 60: 1065-1075;
- [38] Uehata T., Akira S.: mRNA degradation by the endoribonuclease Regnase-1/ZC3H12a/MCP1-1. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1829: 708-713;
- [39] Uehata T., Iwasaki H., Vandenbon A., Matsushita K., Hernandez-Cuellar E., Kuniyoshi K., Satoh T., Mino T., Suzuki Y., Standley D.M., Tsujimura T., Rakugi H., Isaka Y., Takeuchi O., Akira S.: Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4⁽⁺⁾ helper T cells regulates immune activation. *Cell*, 2013; 153: 1036-1049;
- [40] Wang W., Huang X., Xin H.B., Fu M., Xue A., Wu Z.H.: TRAF Family Member-associated NF- κ B Activator (TANK) Inhibits Genotoxic Nuclear Factor κ B Activation by Facilitating Deubiquitinase USP10-dependent Deubiquitination of TRAF6 Ligase. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 13372-13385;
- [41] Xu J., Peng W., Sun Y., Wang X., Xu Y., Li X., Gao G., Rao Z.: Structural study of MCP1 N-terminal conserved domain reveals a PIN-like RNase. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 6957-6965;
- [42] Yokogawa M., Tsushima T., Noda N.N., Kumeta H., Enokizono Y., Yamashita K., Standley D.M., Takeuchi O., Akira S., Inagaki F.: Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 22324; [43] Yu F., Du F., Wang Y., Huang S., Miao R., Major A.S., Murphy E.A., Fu M., Fan D.: Bone marrow deficiency of MCP1 results in severe multi-organ inflammation but diminishes atherogenesis in hyperlipidemic mice. *PLoS One*, 2013; 8: e80089;
- [44] Zhou L., Azfer A., Niu J., Graham S., Choudhury M., Adamski F.M., Younce C., Binkley P.F., Kolattukudy P.E.: Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ. Res.*, 2006; 98: 1177-1185;
- [45] Zhou Z., Miao R., Huang S., Elder B., Quinn T., Papasian C.J., Zhang J., Fan D., Chen Y.E., Fu M.: MCP1 deficiency in mice results in severe anemia related to autoimmune mechanisms. *PLoS One*, 2013; 8: e82542;