

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Jana Kráčmarová

Diverzita proteinového složení stresových granulí u člověka

Protein diversity in human stress granules

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Klára Frydryšková

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.5.2014

.....

Jana Kráčmarová

Chtěla bych upřímně poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Kláře Frydrýškové za její aktivní přístup při konzultacích, užitečné rady a zejména za čas, který mi při přípravě bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Martinovi Pospíškovi, Ph.D. za jeho připomínky a za možnost pracovat v laboratoři biochemie RNA, kterou vede.

Obsah

Seznam použitých zkratk	VI
Abstrakt	VIII
1. Úvod	1
2. Co jsou to stresové granule?	3
3. Mechanismy indukce stresových granulí	6
3.1 Mechanismus indukující tvorbu SG fosforylací eIF2 α	8
3.2 Mechanismy indukující tvorbu SG nezávisle na fosforylaci eIF2 α	9
3.2.1 Inhibice skládání ternárního komplexu	9
3.2.2 Inhibice připojování eIF-4A nebo jeho funkce.....	9
3.2.3 Inhibice funkce eIF-4E	10
3.2.4 Inhibice iniciace translace neznámým způsobem	10
4. Složení stresových granulí	12
5. Vybrané proteiny stresových granulí	25
5.1 Protein mentální retardace způsobené fragilním X (FMRP).....	25
5.1.1 Klinický význam FMRP	26
5.2 Protein související s mentální retardací způsobenou fragilním X chromozomem 1 a 2 (FXR1/2)	27
5.3 Lokalizace FMR1 proteinů v buňce.....	27
5.3.1 FMR1 proteiny v neuronálních transportních RNA granulích	28
5.3.2 FMR1 proteiny ve stresových granulích	28
5.4 Úloha stresových granulí v syndromu fragilního X.....	29
6. Závěr	31
Seznam použité literatury	33

Seznam použitých zkratk

STRESOVÉ FAKTORY

15d-PGJ2	15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2; inhibitor iniciace translace
5'-tiRNA	transfekce buněk syntetickými 5' konci stresem indukovaných malých RNA odvozených od tRNA
DMDA-PatA	desmethyl, desamino-pateamin A; inhibitor iniciace translace
FCCP	karbonyl kyanid(trifluoromethoxy)fenyldrazon; vyvolává mitochondriální stres (inhibuje mitochondriální membránový potenciál)
H₂O₂	peroxid vodíku; vyvolává oxidativní stres
PatA	pateamin A; inhibitor iniciace translace
UV	ultrafialové záření

ZKRATKY PROTEINŮ

4E-BP	protein vázající eukaryotní translační iniciační faktor 4E
4E-T	transportér eukaryotního translačního iniciačního faktoru 4E
Akt	protein kináza B
AMPK	protein kináza aktivovaná 5'-AMP
ATF4	transkripční faktor závislý na cyklickém AMP
ATX2	protein Ataxin-2
Bcl-xL	protein podobný proteinu Bcl-2 1
CASC3	protein CASC3
eIF	eukaryotní translační iniciační faktor
FMRP	protein mentální retardace způsobené fragilním X
FUS	RNA vazebný protein FUS
FXR1/2	protein související s mentální retardací způsobenou fragilním X chromozomem 1/2
G3BP-1/2	protein vázající Ras GTPázu-aktivující protein 1/2
GBLP	protein podobný guanin nukleotid vazebnému proteinu, podjednotka beta-2 1
HD6	histon deacetyláza 6
hnRNP	heterogenní jaderný ribonukleoprotein
HS90	protein tepelného šoku HSP 90
HSP70	protein tepelného šoku 70 kDa
HspB1	protein tepelného šoku beta-1
HuR	protein podobný proteinu ELAV 1
MTOR	serin-threonin protein kináza mTOR
p38-MAPK	p38 mitogenem aktivovaná protein kináza
PABP-1/4	polyA vazebný protein 1/4
PARG	poly(ADP-ribóza) glykohydroláza
PARP	poly(ADP-ribóza) polymeráza
PI3K	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza
PQBP-1	polyglutamin vazebný protein 1

RS6	protein malé ribozomální podjednotky 6
Smaug 1	protein Smaug, homolog 1
SMG-1	serin/threonin protein kináza SMG1
SMN	protein přežití motorických neuronů
Src1	proto-onkogen tyrosin-protein kináza Src
STAU1	protein Staufen vázající dvouvláknovou RNA, homolog 1
TDP-43	TAR DNA vazebný protein
TIA1	nukleolysin TIA-1, izoforma p40
TIAR	nukleolysin TIAR
TRAF2	faktor asociovaný s TNF receptorem 2
TTP	protein Tristetraprolin
YBOX1	element vázající protein senzitivní k nukleáze 1

OSTATNÍ ZKRATKY

40S	malá podjednotka eukaryotického ribozomu
43S	eukaryotický translační preiniciační komplex
48S	eukaryotický translační iniciační komplex
48S*	nekompletní eukaryotický translační iniciační komplex
60S	velká podjednotka eukaryotického ribozomu
80S	eukaryotický ribozom
AdOx	adenosin-2',3'-dialdehyd; inhibitor methyltransferáz
F11	hybridní buněčná linie odvozená z myšího neuroblastomu a krysích spinálních ganglionů
FRAP	metoda určování pohyblivosti fluorescenčně značených molekul, která měří fluorescenci po počátečním vysvícení (podle anglického F luorescence R ecovery A fter P hotobleaching)
FXS	syndrom fragilního X
HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk izolovaných z adenokarcinomu děložního hrdla
LMB	leptomycin B; inhibitor jaderného exportu zprostředkovaného Exportinem-1
m7G	7-methylguanosin
MEF	buněčná linie myších embryonálních fibroblastů
Met	aminokyselina methionin
NES	jaderný exportní signál
NGF	nervový růstový faktor
NLS	jaderný lokalizační signál
PC-12	buněčná linie krysích buněk izolovaných z feochromocytomu
polyQ	aminokyselinová sekvence bohatá na aminokyselinu glutamin
RNP	ribonukleoprotein
SG	stresové granule
SG⁺	buňky obsahující stresové granule
siRNA	malé interferující RNA
STEK	buněčná linie myších embryonálních buněk nesoucí delecii genu <i>fmr1</i>
tiRNA	stresem indukované malé RNA odvozené od tRNA
U-2 OS	buněčná linie lidských epiteliálních buněk izolovaných z osteosarkomu

Abstrakt

Během nepříznivých podmínek je v eukaryotických buňkách inhibována translace některých mRNA a přednostně jsou syntetizovány proteiny, které se podílejí na boji buňky se stresem. Takto ušetřená energie je využita na opravy poškození buněčných struktur. Nepřekládané mRNA se v podobě ribonukleoproteinových komplexů hromadí a důsledkem je vznik cytoplazmatických stresových granulí. V nich dochází k úpravě struktury a složení těchto komplexů a následně je rozhodováno o jejich osudu - mohou být uskladněny, degradovány nebo vráceny do cytoplazmy pro znovuzahájení jejich překladu. Molekuly mRNA s sebou do stresových granulí přinášejí i proteiny, které se na ně vážou. Mezi takovými proteiny mohou být i aktéři signálních drah a stresové granule se tak nepřímo podílejí na regulaci buněčných dějů, jako je například apoptóza, a hrají tak důležitou roli v přežívání buňky během nepříznivých podmínek. Tato práce pojednává o proteinovém složení stresových granulí v lidských buněčných liniích, stručně charakterizuje stresové faktory, které ke vzniku stresových granulí vedou a věnuje se rozdílům ve složení stresových granulí indukovaných různými stresovými faktory. Součástí práce je tabulka shrnující proteiny, které se v těchto granulích vyskytují. Ve druhé části se práce věnuje charakterizaci proteinů z rodiny proteinů mentální retardace způsobené fragilním X a stručně nastiňuje možnou souvislost syndromu fragilního X a stresových granulí.

Klíčová slova: buněčný stres, stresové granule, proteinové složení stresových granulí, inhibice translace, FMRP, FXR1, FXR2, lidské buněčné linie

Abstract

During unfavourable conditions eukaryotic cells inhibit translation of certain mRNAs and preferably synthesize proteins that are involved in the stress response. The saved energy is used for repair of cellular damages. The untranslated mRNAs are accumulated in the form of ribonucleoprotein complexes. This accumulation results in the formation of the cytoplasmic stress granules. These granules are sites of structure remodeling and triage of the ribonucleoprotein complexes - they can be stored, degraded or sent back to the cytoplasm for translation reinitiation. The mRNA molecules carry their associated proteins, which include also proteins implicated in the cell signaling. Stress granules can thus indirectly regulate some processes, such as apoptosis, and play role in the survival of the cell. This thesis focuses on protein content of stress granules in human cell lines, briefly characterizes stress factors that induce their formation and discusses differences between the content of stress granules induced by different stress stimuli. An important part of this thesis is a table summarizing proteins found in the stress granules. The second part of this work is dedicated to the characterization of the proteins of the fragile X mental retardation protein family. It outlines the possible link between the fragile X syndrome and stress granules.

Keywords: cellular stress, stress granules, protein composition of stress granules, translation inhibition, FMRP, FXR1, FXR2, human cell lines

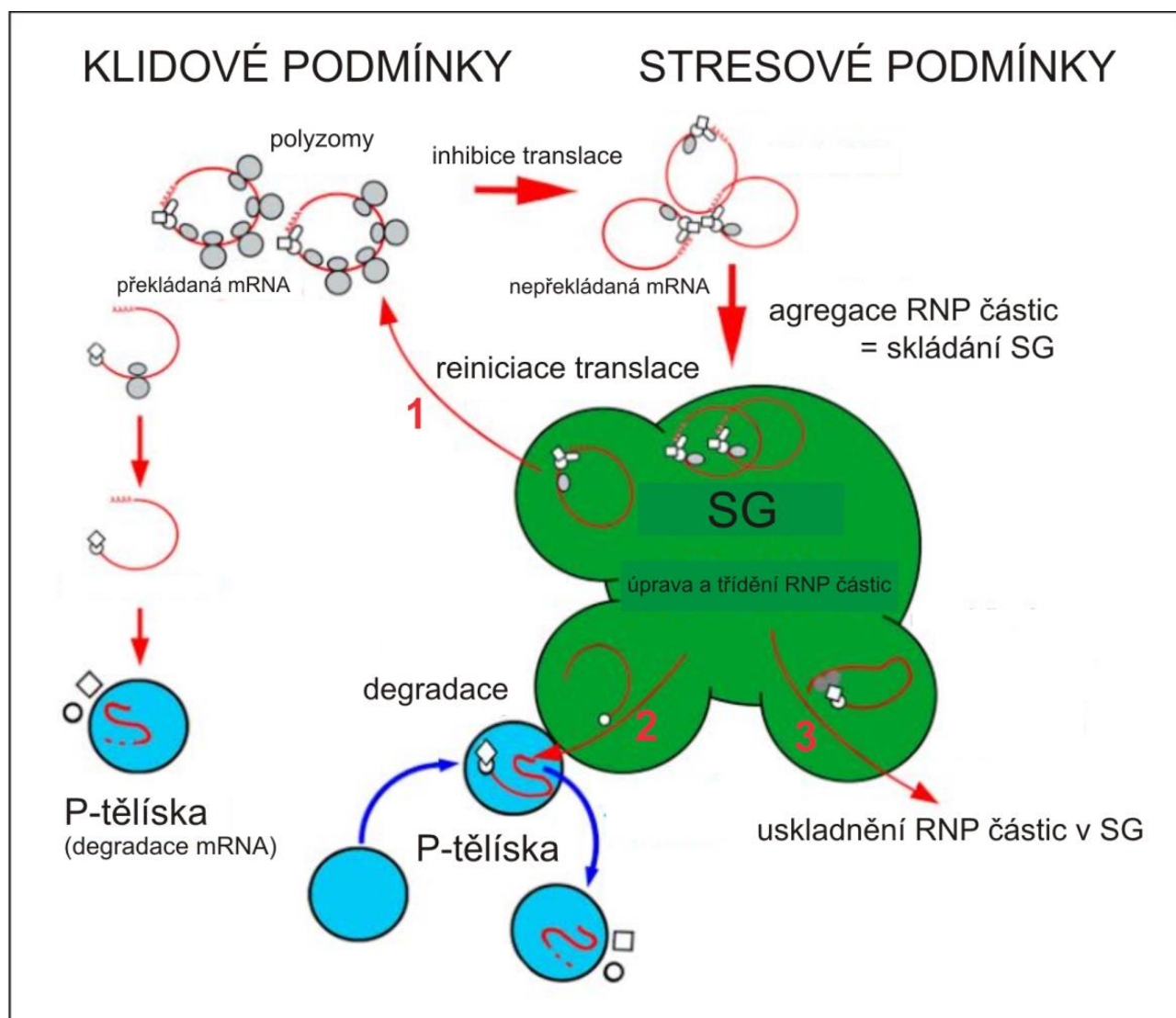
1. Úvod

Přepis genetické informace z DNA do RNA a následná syntéza proteinu je proces, který probíhá v každé živé buňce a byl poprvé popsán již v roce 1970 Francisem Crickem v jeho článku „Central dogma of molecular biology“ (Crick 1970). Existuje řada možností, jak tento energeticky náročný proces regulovat, v závislosti na aktuálních potřebách buňky, daných zejména vnějšími podmínkami.

Během reakce buňky na stres dochází k selektivní inhibici syntézy některých proteinů a ušetřenou energii buňka investuje do opravy poškození způsobených stresem, případně do adaptace na nové podmínky. Důsledkem je rozpad polyzomů a vznik cytoplazmatických tělísek, které obsahují ribonukleoproteinové (RNP) částice, tvořené nepřekládanými molekulami mRNA, některými translačními iniciačními faktory a RNA vazebnými proteiny. Tyto agregáty RNP částic se nazývají stresové granule a od ostatních cytoplazmatických RNA granulí se liší jejich specifickým vznikem pouze během stresu. Vedle stresových granulí můžeme v cytoplazmě nalézt i další druhy RNA granulí, konkrétně jsou to P-tělíska, neuronální transportní granule a granule v zárodečných buňkách. P-tělíska jsou místem, kde dochází k degradaci mRNA a jsou v souvislosti se stresovými granulemi často zmiňována, ale na rozdíl od stresových granulí jsou v buňkách přítomny neustále a během stresu se pouze zvyšuje jejich počet. P-tělíska nejsou předmětem této práce.

Zdá se, že stresové granule jsou místem, kde dochází ke změnám struktury a složení ribonukleoproteinových částic (tzv. remodeling) a je zde rozhodováno o dalším osudu mRNA uvolněných z polyzomů (viz Obrázek 1). Molekuly mRNA mohou být v granulích uskladněny a po odeznění stresu mohou být opětovně použity pro translaci, aniž by musely být znovu syntetizovány. Kromě uskladnění existují i další varianty osudu těchto mRNA - mohou být degradovány, nebo navraceny do cytoplazmy pro opětovné zahájení jejich translace.

Ukazuje se, že kromě komponent, které jsou všem stresovým granulím společné (tj. nepřekládané molekuly mRNA, malé podjednotky ribozomu, některé translační iniciační faktory a jeden či více primárních agregačních proteinů), mohou obsahovat i další součásti, jako jsou RNA vazebné proteiny ovlivňující stabilitu jejich cílových mRNA, proteiny signálních drah, nebo enzymy zajišťující posttranslační modifikace. Složení stresových granulí se může lišit v závislosti na stresovém podnětu a buněčném typu.



Obrázek 1: Schéma zobrazující možné osudy mRNA během klidových a stresových podmínek. Během klidových podmínek mohou být molekuly mRNA překládány v polyzomech nebo degradovány. Jednou ze struktur, kde probíhá degradace mRNA, jsou P-tělíska. Při reakci buňky na stresové faktory dochází k inhibici translace, rozpadu polyzomů a agregaci RNP částic (tj. nekompletních translačních iniciačních komplexů asociujících s RNA vazebnými proteiny) a vzniku stresových granulí. Ve stresových granulích je rozhodováno o osudu mRNA molekul. Ty mohou být po dobu stresu uskladněny, degradovány, nebo navraceny do cytoplazmy pro opětovné zahájení jejich překlada. Převzato a upraveno podle Kedersha *et al.* (2005).

Cílem této bakalářské práce je:

I. Vypracovat a okomentovat přehlednou tabulku shrnující proteiny přítomné ve stresových granulích v lidských buněčných liniích, s výjimkou stresových granulí indukovaných virovou infekcí.

II. Proteiny z rodiny proteinů mentální retardace způsobené fragilním X jsou klinicky významné a zároveň se vyskytují ve stresových granulích. Cílem je popsat za jakých podmínek lokalizují do stresových granulí, jaké experimenty byly provedeny v souvislosti s jejich rolí ve stresových granulích a stručně nastínit jejich klinický význam.

2. Co jsou to stresové granule?

Stresové granule (SG) jsou ribonukleoproteinové částice, vznikající v eukaryotních buňkách při inhibici iniciace translace (Kedersha *et al.* 1999). K té přirozeně dochází během reakce buňky na stresové faktory, jako je například působení vysokých či nízkých teplot, působení toxických látek (např. arsenitan sodný), nebo osmotický šok. Represí translace buňka šetří energii, kterou může použít na opravu poškození způsobených stresem.

Stejně jako ostatní cytoplazmatické RNA granule obsahují stresové granule polyadenylovanou mRNA, ale navíc mohou obsahovat i některé součásti translačního iniciačního komplexu (48S), které v jiných RNA granulích chybí (např. polyA vazebný protein, PABP-1; malá podjednotka ribozomu, 40S; eukaryotní translační iniciační faktor 4G, eIF-4G; eukaryotní translační iniciační faktor 4A, eIF-4A) (Kedersha *et al.* 2002; Kedersha *et al.* 1999; Kim *et al.* 2005). Distribuce SG v cytoplazmě není náhodná; nejčastěji se nacházejí v perinukleárním prostoru a vzhledem k jejich velikosti (0,2 až více než 4 μm v průměru) a vysoké denzitě jsou pozorovatelné světelným mikroskopem (Ivanov *et al.* 2003).

Existují různé molekulární mechanismy, které vedou k inhibici iniciace translace, ale jedno mají všechny společné - vznik nekompletních translačních iniciačních komplexů (48S*), které nejsou schopné vázat velkou ribozomální podjednotku (60S) a zahájit translaci. Právě tyto deficitní komplexy jsou specifickou součástí stresových granulí (Kedersha *et al.* 2002). Tvorba iniciačního komplexu zahrnuje řadu po sobě jdoucích kroků, během kterých nasedá malá ribozomální podjednotka (40S) za pomoci translačních iniciačních faktorů na polyadenylovanou molekulu mRNA. Tento děj je stručně popsán v kapitole 3. Po vzniku nefunkčního iniciačního komplexu dokončí ribozomy, které jsou na mRNA již složené její překlad a jsou uvolněny, neboli dochází k rozpadu polyzomu. Rozpad polyzomů je pro skládání stresových granulí klíčový. Působením chemických látek, které stabilizují polyzomy (např. cykloheximid nebo emetin) je tvorba SG inhibována (Kedersha *et al.* 2000). Na uvolněnou mRNA se následně vážou přes své RNA vazebné domény primární agregační proteiny, které multimerizují a řídí shlukování 48S* komplexů skrze svoje agregační domény. Mezi nejdůležitější agregační proteiny patří nukleolysin TIA-1, izoforma p40 (TIA1) (Gilks *et al.* 2004), nukleolysin TIAR (TIAR) (Mazan-Mamczarz *et al.* 2006), protein vázající Ras GTPázu-aktivující protein 1 (G3BP-1) (Tourriere *et al.* 2003) a protein vázající Ras GTPázu-aktivující protein 2 (G3BP-2) (Matsuki *et al.* 2013). Skládání SG probíhá ve dvou fázích - nejprve se tvoří menší agregáty, které se následně spojují ve větší granule. Po odeznění stresu dochází k jejich rozpouštění (Zhang *et al.* 2011). Na skládání SG se podílejí i mikrotubuly, ovšem do jaké míry není jasné. Depolymerizace mikrotubulů pomocí drog vedla v některých experimentech k výrazné inhibici tvorby stresových granulí, v jiných pouze zabránila splývání menších granulí ve větší (Fujimura *et al.* 2009; Ivanov *et al.* 2003; Kolobova *et al.* 2009; Kwon *et al.* 2007).

Stresové granule se pod mikroskopem jeví jako statické a málo pohyblivé struktury (Kedersha *et al.* 2005). Původně se myslelo, že slouží pouze jako skladiště nepřekládaných mRNA molekul, a že se podílejí

na represi translace. Představa byla taková, že se molekuly mRNA akumulují v granulích a po odeznění stresu jsou navraceny do cytoplazmy, kde je opětovně zahájen jejich překlad (Kedersha *et al.* 1999). Tato domněnka byla podpořena faktem, že první objevené agregační proteiny TIA1 a TIAR fungují zároveň jako represory translace (Mazan-Mamczarz *et al.* 2006; Piecyk *et al.* 2000). Později byly ovšem objeveny některé vlastnosti stresových granulí, které nejsou v souladu s tímto modelem. Za prvé, SG jsou dynamické struktury a část jejich obsahu, molekuly mRNA i proteiny, jsou z agregátů uvolňovány a opět do nich vstupují s vysokou frekvencí. Tvorba větších agregátů jeví se jako granule je tak dána rozrušením rovnováhy mezi „odtokem“ a „přítokem“ ve prospěch přítoku, spíše než prostou akumulací komponent stresových granulí (Kedersha *et al.* 2000). Fluorescenčně značenou sondou byly vizualizovány molekuly mRNA a pomocí měření návratu fluorescence po počátečním vysvícení (tzv. FRAP analýza, podle anglického **F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching) bylo zjištěno, že přibližně třetina veškeré mRNA v buňce je pevně vázána v SG, třetina migruje mezi SG a cytoplazmou a třetina se nachází volně v cytoplazmě (Zhang *et al.* 2011). Za druhé, obsah SG je v dynamické rovnováze s polyzomy. Inhibice elongační fáze translace vede k zadržení ribozomů na mRNA, neboli ke stabilizaci polyzomů. Za takovýchto podmínek dochází k rozpouštění SG. Navíc tento jev názorně demonstruje, že podmínkou pro tvorbu SG je inhibice specifické fáze translace, to jest iniciace, nikoli inhibice translace obecně. Předčasná terminace translace vede naopak k rozpadu polyzomů a indukuje vznik SG (Kedersha *et al.* 2000). Za třetí, inhibice translace může probíhat, i když je bráněno vzniku SG. Při indukci SG arsenitanem v buněčné linii myších embryonálních fibroblastů (MEF) s odstraněným genem pro histon deacetylázu 6 (HD6) tvořilo SG jen 25% buněk (oproti 80% buněk syntetizujících HD6), ale míra represe translace byla stejná u obou typů buněk (Kwon *et al.* 2007).

Tyto zjištění rozvrátily představu o stresových granulích, jakožto pasivním skladišti nepřekládaných mRNA a byl navrhnut model „třídícího centra“ (Kedersha *et al.* 2000). Podle tohoto modelu jsou stresové granule místem, kam jsou transportovány nepřekládané mRNA molekuly ve formě RNP komplexů, jejichž struktura a složení jsou v SG upraveny a dochází k jejich aktivnímu třídění. Některé mRNA mohou být opravdu stabilizovány a uskladněny v SG během působení stresu, jiné ale mohou být určeny k degradaci nebo k pokusu o znovuzahájení jejich překladu. Podíl na rozhodování o osudu jednotlivých mRNA mají proteiny, které se na ně vážou. Ty mohou ovlivňovat translaci jako takovou (př. TIA1), stabilitu mRNA (př. protein podobný proteinu ELAV 1; HuR) či jejich degradaci (př. Tristetraprolin; TTP) (Gallouzi *et al.* 2000; Piecyk *et al.* 2000; Stoecklin *et al.* 2004). Kromě této třídící funkce mohou SG vyvazovat některé signální proteiny a regulovat tak signální dráhy. Takovými signálními proteiny mohou být proapoptické faktory - protein podobný guanin nukleotid vazebnému proteinu, podjednotka beta-2 1 (GBLP) (Ohn *et al.* 2008) nebo faktor asociovaný s TNF receptorem 2 (TRAF2) (Kim *et al.* 2005). Stresové granule jsou tedy důležité i pro regulaci apoptózy při působení stresu.

Během reakce buněk na stresové faktory jsou translačně umlčeny pouze některé mRNA. Molekuly mRNA kódující proteiny, které se podílejí na opravě buněk a jejich adaptaci na nepříznivé podmínky jsou ze stresových granulí selektivně vyloučeny, aby mohl i nadále probíhat jejich překlad. Mezi takové mRNA patří mRNA kódující protein teplotního šoku 70 kDa (HSP70) (Nover *et al.* 1989), protein teplotního šoku HSP

90 (HS90) (Stohr *et al.* 2006), nebo transkripční faktor závislý na cyklickém AMP (ATF4) (Harding *et al.* 2000).

3. Mechanismy indukce stresových granulí

Existují různé faktory, které vyvolávají buněčný stres vedoucí k inhibici iniciace translace. Mohou to být nepříznivé podmínky (např. vysoká či nízká teplota, hyperosmotické prostředí, ultrafialové záření) nebo chemické látky (např. arsenitan sodný, bortezomib, clotrimazol). Při iniciaci translace dochází ke skládání translačního iniciačního komplexu, což je proces zahrnující několik po sobě jdoucích kroků (viz Obrázek 2):

(1) **Složení ternárního komplexu.** Dochází k připojení tRNA nesoucí aminokyselinu methionin (Met) k eukaryotnímu translačnímu iniciačnímu faktoru 2 (eIF2), který zároveň váže GTP. Během iniciace translace je molekula GTP hydrolyzována ($\text{eIF2-GTP} \rightarrow \text{eIF2-GDP} + \text{P}_i$) a aby mohl být eIF2 znovu použit, musí být recyklován a musí dojít k výměně GDP za GTP. Tuto výměnu zajišťuje eukaryotní translační iniciační faktor 2B (eIF-2B).

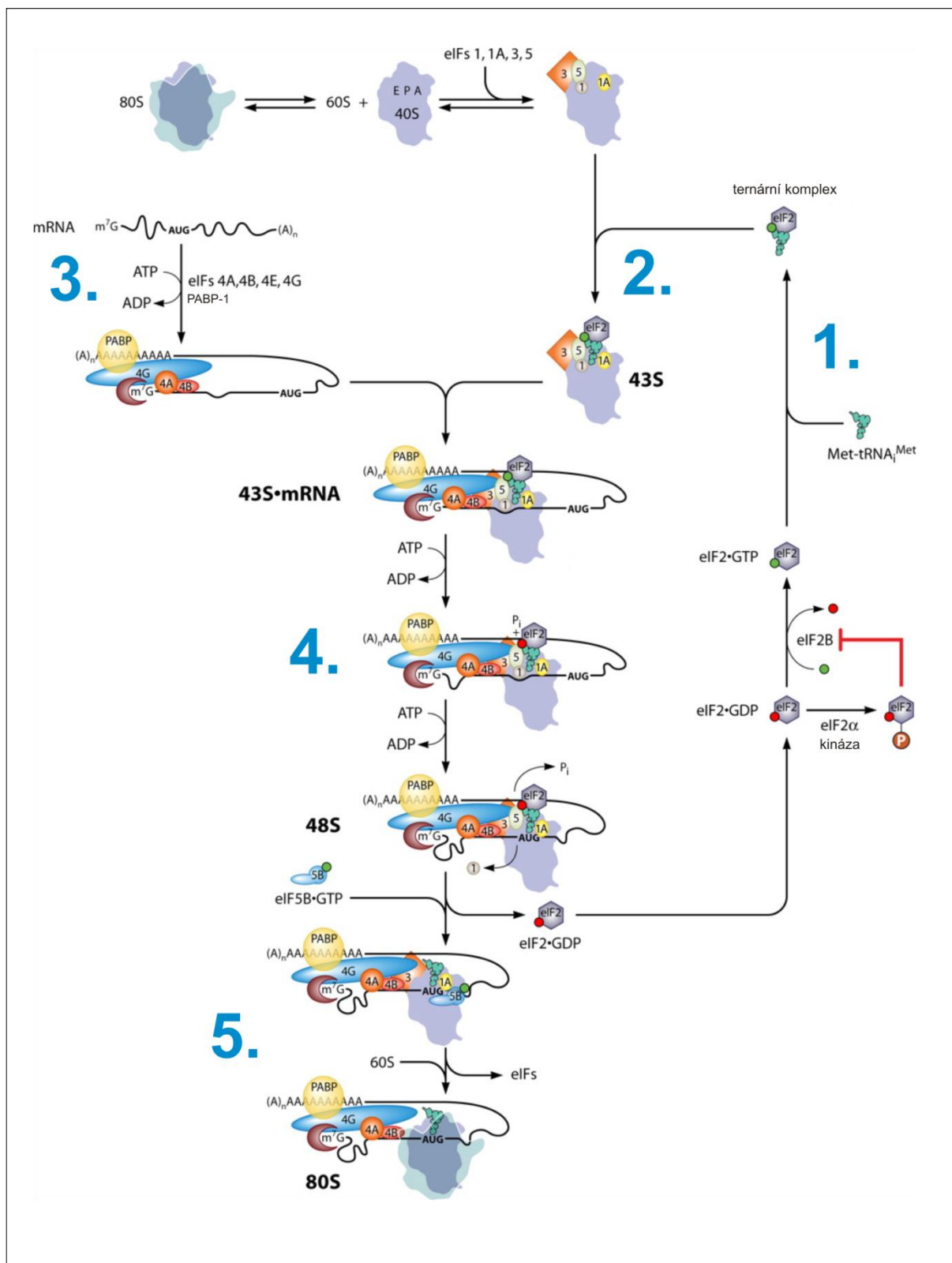
(2) **Složení preiniciačního komplexu (43S),** jehož součástí je malá podjednotka ribozomu (40S), eukaryotní translační iniciační faktory 1, 1A, 3, 5 a ternární komplex (eIF2-GTP-tRNA^{Met}).

(3) **Aktivace molekuly mRNA.** Na polyadenylovaný konec mRNA se váže PABP-1. Na 5' konec mRNA se váže eIF-4F komplex, který je tvořen třemi iniciačními faktory - eIF-4E, eIF-4A a eIF-4G. Translační iniciační faktor 4E rozeznává a váže 7-methylguanosinovou (m7G) čepičku. Translační iniciační faktor 4A funguje jako RNA helikáza, která rozplétá sekundární struktury na molekule mRNA, čímž usnadňuje vazbu preiniciačního komplexu. Translační iniciační faktor 4G slouží jako lešení propojující eIF-4E, eIF-4A, eIF3 a PABP-1 a umožňuje cirkularizaci mRNA.

(4) **Složení iniciačního komplexu (48S).** Preiniciační komplex (43S) se váže na aktivovanou molekulu mRNA a zahájí tzv. skenování, během kterého hledá iniciační kodón AUG na mRNA. Po rozpoznání iniciačního kodónu dojde ke změně konformace 43S komplexu z otevřené na uzavřenou a vzniká 48S komplex. Během skenování dochází k hydrolýze GTP vázaného na eIF2 a po rozpoznání iniciačního kodónu i k uvolnění eIF2-GDP z iniciačního komplexu.

(5) **Připojení velké ribozomální podjednotky (60S).** Současně s uvolněním eIF2-GDP z iniciačního komplexu dochází k připojení eukaryotního translačního iniciačního faktoru 5B (eIF-5B), který katalyzuje připojení 60S podjednotky ribozomu za vzniku funkčního ribozomu (80S) schopného zahájit translaci a uvolnění některých iniciačních faktorů.

Pro více podrobností o skládání translačního iniciačního komplexu a iniciaci translace doporučuji přečíst shrnující článek od Jackson *et al.* (2010).



Obrázek 2: Inicie translace v eukaryotních buňkách. Na obrázku je schematicky znázorněna iniciační fáze translace v eukaryotních buňkách. Číselné označení jednotlivých kroků na obrázku odpovídá číselnému označení kroků iniciace translace popsané v kapitole 3. Převzato a upraveno podle Hinnebusch (2011).

Stresové faktory můžeme rozdělit do dvou základních skupin podle mechanismu, kterým znemožňují skládání funkčních 48S komplexů a indukují tak tvorbu stresových granulí. Může to být buď mechanismus závislý na fosforylaci eIF2 α (viz kapitola 3.1), nebo mechanismy na této fosforylaci nezávislé (viz kapitola 3.2). Některé stresové faktory mohou indukovat tvorbu SG kombinací více mechanismů (Emara *et al.* 2012; Fujimura *et al.* 2012).

3.1 Mechanismus indukující tvorbu SG fosforylací eIF2 α

Prvně objeveným a nejlépe objasněným mechanismem inhibice iniciace translace v lidských buňkách je fosforylace alfa podjednotky eIF2 (eIF2 α), která dále znemožňuje sestavení funkčního ternárního komplexu (Kedersha *et al.* 1999). Správně složený ternární komplex je předpokladem k úspěšnému připojení 43S komplexu k mRNA (Fraser *et al.* 2007). Připojení velké ribozomální podjednotky a zahájení translace je umožněno hydrolýzou molekuly GTP, která je v ternárním komplexu nesena alfa podjednotkou eIF2. Fosforylovaný eIF2 α (P-eIF2 α) se stává kompetitivním inhibítozem eIF-2B a brání tak recyklaci GDP za GTP. V buňce se v důsledku toho hromadí „nenabitě“ eIF2 vázající GDP, tvorba funkčních ternárních komplexů je inhibována a s ní i iniciace translace (shrnutí v Jackson *et al.* 2010).

Tento mechanismus vyvolává naprostá většina stresových faktorů využívaných při studiu stresových granulí, jako je působení vysoké teploty, arsenitanu nebo ultrafialového záření (UV) (pro kompletní výčet těchto faktorů viz Tabulka 1). Oblíbeným způsobem jak zjistit, jestli je indukce SG za použitého stresového faktoru závislá na fosforylaci eIF2 α , je využití buněčné linie MEF produkující nefosforylovatelnou formu eIF2 α , která má na pozici 51 místo serinu alanin (eIF2 α S51A). Pokud testovaný faktor indukuje SG i v této mutantní linii, využívá mechanismus na fosforylaci eIF2 α nezávislý (Kim *et al.* 2007).

Vedle klasických stresových faktorů používaných k indukci stresových granulí mohou být SG indukovány i zvýšenou produkcí některých RNA proteinů (pro výčet těchto proteinů viz Tabulka 1). Při nadprodukcí agregačního proteinu G3BP-1 byl pozorován vznik malých SG, aniž by došlo ke zvýšení obsahu P-eIF2 α v buňce a k inhibici translace. Když tyto SG dosáhly určité velikosti, množství P-eIF2 α v buňce výrazně vzrostlo a translace byla inhibována. Při experimentu s MEF buněčnou linií exprimující eIF2 α S51A bylo zjištěno, že malé SG opravdu vznikají nezávisle na fosforylaci eIF2 α (Reineke *et al.* 2012). Je možné, že skládání malých SG je způsobeno zvýšenou koncentrací agregačních domén G3BP-1 v cytoplazmě, a ve chvíli kdy je přesaženo určité množství syntetizovaných proteinů, které je buňka ještě schopna správně sbalit, dojde k vyvolání stresové reakce (tzv. unfolded protein response). Jestli je tento mechanismus společný všem proteinům schopným indukovat svojí nadprodukcí SG, nebo při nadprodukcí jiných proteinů předchází fosforylace eIF2 α vzniku SG, je nezodpovězenou otázkou.

Naproti tomu existují i proteiny, které jsou za působení určitých stresových faktorů součástí SG, ale jejich nadprodukce nejenom že neindukuje vznik SG, ale naopak ho inhibuje. Mezi takové patří poly(ADP-ribóza)

glykohydroláza (PARG) (Leung *et al.* 2011), polyglutamin vazebný protein 1 (PQBP1) (Kunde *et al.* 2011), protein Staufén vázající dvouvláknovou RNA, homolog 1 (STAU1) (Thomas *et al.* 2009) a element vázající protein senzitivní k nukleáze 1 (YBOX-1) (Tanaka *et al.* 2014). Bylo zjištěno, že některé proteiny stresových granulí (např. TIA1, G3BP-1 nebo Argonaut 2) jsou ADP-ribosylovány (posttranslační připojování polymerů ADP-ribózy). Nadprodukce enzymů katalyzujících syntézu poly(ADP)-ribózy dokonce indukuje vznik SG bez působení dalšího stresu. Naproti tomu nadprodukce enzymů štěpících tyto polymery (PARG) inhibuje tvorbu SG. Zdá se, že ADP-ribosylace některých proteinů stresových granulí je funkčně důležitá pro jejich skládání a přetrvávání v buňce (Leung *et al.* 2011). Způsob jakým PQBP-1 inhibuje tvorbu SG není znám, nicméně prokazatelně souvisí s jeho schopností vázat se na polyglutaminové (polyQ) oblasti jiných proteinů (zvýšená produkce PQBP-1 v buněčné linii F11 vedla k výrazné redukci SG⁺ buněk, kdežto zvýšená produkce PQBP-1 s mutací v polyQ vazebné doméně vedla pouze k mírnému snížení tvorby SG) (Kunde *et al.* 2011). STAU1 je produkován v mnoha různých tkáních a brání skládání SG vazbou na ribozomy a následnou stabilizací polyzomů (Thomas *et al.* 2009). Po působení arsenitanu se YBOX-1 váže na HSP70 mRNA a indukuje její překlad (Tanaka *et al.* 2014). Zvýšená produkce HSP70 brání agregaci TIA1, čímž brání skládání SG (Gilks *et al.* 2004). Nezdá se, že by mechanismy inhibice tvorby SG při nadprodukcí těchto proteinů měly mnoho společného.

3.2 Mechanismy indukující tvorbu SG nezávisle na fosforylaci eIF2 α

Mechanismy indukující tvorbu SG nezávisle na fosforylaci eIF2 α můžeme rozdělit do tří skupin. Mohou buď bránit tvorbě funkčního ternárního komplexu (viz kapitola 3.2.1), inhibovat připojování, popř. funkci eIF-4A (viz kapitola 3.2.2), nebo inhibovat funkci eIF-4E (viz kapitola 3.2.3). Některé stresové faktory indukují tvorbu SG nezávisle na fosforylaci eIF2 α , ale jakým způsobem tedy inhibují iniciaci translace, nevíme (viz kapitola 3.2.4).

3.2.1 Inhibice skládání ternárního komplexu

Vedle fosforylace eIF2 α je další možností jak zabránit tvorbě ternárního komplexu odstranění eIF2 α pomocí siRNA interference nebo znemožnění vazby mezi tRNA^{Met} a eIF2 pomocí specifického inhibitoru (NSC 119893) (Mokas *et al.* 2009).

3.2.2 Inhibice připojování eIF-4A nebo jeho funkce

Iniciační faktor eIF-4A je ATP dependentní RNA helikáza a participuje na připojení 43S komplexu k molekule mRNA a následném pohybu iniciačního komplexu po mRNA ve směru 5' $\rightarrow$ 3' (tzv. skenování), při kterém je vyhledáván iniciační kodón. Pro svou správnou aktivitu musí eIF-4A vázat iniciační faktory eIF-4G a eIF-4B (shrnuto v Jackson *et al.* 2010). Poměrně nedávno byly objeveny tři malé molekuly, které inhibují translaci a indukují vznik SG mechanismem, který brání aktivitě eIF-4A - pateamin A (PatA), hippuristanol a 15d-PGJ2.

Pateamin A, jeho analog desmethyl, desamino-PatA (DMDA-PatA) a protizánětlivý prostaglandin 15d-PGJ2 se vážou na eIF-4A a brání tak jeho vazbě k eIF-4G, čímž je rozrušen eIF-4F komplex (Kim *et al.* 2007; Low *et al.* 2005). Hippuristanol brání vazbě eIF-4A na molekulu mRNA (Bordeleau *et al.* 2006).

3.2.3 Inhibice funkce eIF-4E

Iniciační faktor eIF-4E se váže m7G čepičku mRNA a je základnou pro sestavení eIF-4F komplexu. Jeho dostupnost pro tvorbu eIF-4F komplexu je regulována pomocí eIF-4E vazebného proteinu (4E-BP). Když je 4E-BP v hypofosforylovaném stavu, váže se na eIF-4E a brání jeho asociaci s eIF-4G, čímž blokuje sestavení eIF-4F komplexu. K hypofosforylaci 4E-BP dochází, když je inhibována serin/threonin protein kináza mTOR (shrnutí v Jackson *et al.* 2010).

Mechanismus indukce SG pomocí inhibice funkce eIF-4E byl popsán teprve v roce 2012 a doposud s ním byly spojeny pouze dva stresové faktory - peroxid vodíku (H₂O₂) a seleničitan sodný. Oba tyto faktory vedou navíc i k fosforylaci eIF2 α , ale vznik SG je na ní nezávislý, což bylo ověřeno experimentálně pomocí MEF eIF2 α S51A. V případě peroxidu byla tvorba SG zcela zachována, SG indukované seleničitanem v mutantní linii byly o trochu menší, než v linii exprimující normální eIF2 α (Emara *et al.* 2012; Fujimura *et al.* 2012).

Působení peroxidu vodíku vede k hypofosforylaci 4E-BP1, který v tomto stavu pevně váže eIF-4E. Ten neztrácí schopnost vázat se na čepičku mRNA, ale neumožňuje připojení eIF-4G a eIF-4A, v důsledku čehož nevzniká eIF-4F komplex. Pomocí fluorescenčně značených protilátek byl navíc pozorován přesun eIF-4E i jeho transportéru 4E-T z cytoplazmy do jádra, což koresponduje s jejich nepřítomností v SG. Působení seleničitanu vede taktéž k hypofosforylaci 4E-BP1 a narušení tvorby eIF-4F komplexu, ale na rozdíl od SG indukovaných peroxidem obsahují SG indukované seleničitanem eIF-4E (lokalizace 4E-T nebyla zjišťována). U obou stresových faktorů je komplex 4E-BP:eIF-4E funkčně důležitý pro tvorbu SG (Emara *et al.* 2012; Fujimura *et al.* 2012).

Složení SG indukovaných mechanismem inhibujícím funkci eIF-4E je odlišné od složení SG indukovaných ostatními mechanismy (viz kapitola 4).

3.2.4 Inhibice iniciace translace neznámým způsobem

Existují stresové faktory, které indukují tvorbu SG nezávisle na fosforylaci eIF2 α , ale není jasné, jakým způsobem tedy inhibují iniciaci translace. Jedná se o působení nízkých teplot a transfekci buněk syntetickými 5' konci stresem indukovaných malých RNA odvozených od tRNA (tiRNA).

Tvorba SG během působení nízké teploty je navíc nezávislá i na komplexu 4E-BP:eIF-4E a byla narušena, když byla inhibována protein kináza aktivovaná 5'-AMP (AMPK) a proto-onkogen tyrosin-protein kináza Src (Src1). Tyto kinázy jsou tedy zřejmě součástí signální dráhy vedoucí až k indukci SG (Hofmann *et al.* 2012).

V několika recentních publikacích byl nastíněn nový mechanismus indukce SG pomocí tiRNA. Při vystavení buněk vysoké teplotě, arsenitanu nebo UV záření dochází ke štěpení molekul tRNA na dvě části - 3'-tiRNA a 5'-tiRNA. Toto štěpení zajišťuje ribonukleáza Angiogenin a je na fosforylaci eIF2 α nezávislé, ba

naopak se zdá být fosforylaci eIF2 α inhibováno. Molekuly 5'-tiRNA způsobují neznámým způsobem represi translace a při působení stresu, kterým může být i samotná transfekce syntetických 5'-tiRNA, tvorbu SG (Emara *et al.* 2010; Yamasaki *et al.* 2009).

Syntéza M9M peptidu indukuje tvorbu SG, ale mechanismus této indukce nebyl zjišťován. Nevíme, jestli je nebo není závislá na fosforylaci eIF2 α . M9M je rekombinantní peptid, který se váže s vysokou afinitou na Transportin-1, čímž inhibuje jaderný import řízený tímto transportním receptorem. Důsledkem je akumulace proteinů využívajících tento způsob importu v cytoplazmě (např. RNA vazebný protein FUS) a vznik stresových granulí (Dormann *et al.* 2010).

Zajímavé je, že ačkoli je inhibice iniciace translace nutnou podmínkou pro vznik stresových granulí (výjimkou jsou malé SG vznikající při nadprodukci G3BP-1), neplatí, že SG vznikají pokaždé, když je iniciace translace inhibována. Odstranění některých proteinů podílejících se na připojování velké ribozomální podjednotky k iniciačnímu komplexu (translační iniciační faktor 5B a protein velké ribozomální podjednotky L28), případně znemožnění jejího připojení působením farmaceutik vede k represi translace, ale neindukuje vznik SG. Pro indukci SG musí být zřejmě inhibována preiniciační fáze translace, tj. tvorba funkčních iniciačních komplexů. Nicméně ani inhibice preiniciační fáze translace není zárukou tvorby SG. Příkladem je situace, kdy odstranění eIF-4E nevede ke vzniku SG, ačkoli vede k represi translace (Mokas *et al.* 2009). Na rozdíl od velké podjednotky ribozomu byl eIF-4E při mnoha experimentech nalezen ve stresových granulích a jeho fyzická přítomnost v buňce je důležitá, ovšem nikoli nezbytná, pro správnou tvorbu SG indukovanou různými druhy stresových faktorů (Fournier *et al.* 2013). Přidání arsenitanu k HeLa buňkám deficitním pro eIF-4E vedlo k tvorbě SG ve 30% těchto buněk (oproti 90% SG⁺ kontrolních buněk s funkčním eIF-4E) (Fournier *et al.* 2013). V jiném experimentu vedlo odstranění eIF-4E pouze k mírnému snížení počtu buněk tvořících SG po přidání arsenitanu (z 90% SG⁺ buněk s funkčním eIF-4E na 80% SG⁺ buněk s depletovaným eIF-4E) (Emara *et al.* 2012). Tyto výsledky napovídají, že eIF-4E hraje důležitou roli ve skládání SG, ale není pro jejich tvorbu esenciální. Samotné odstranění eIF-4E v HeLa buňkách pomocí siRNA interference vedlo k redukci translace na 60% v porovnání s kontrolními buňkami, ale neindukovalo tvorbu SG (resp. indukovalo tvorbu SG v < 0,1% buněk) (Mokas *et al.* 2009). Nakolik je represe translace opravdu nezávislá na tvorbě SG a jaký podíl má na této případné nezávislosti prostá absence důležitých stavebních komponent stresových granulí (případně jejich inaktivace) je otázkou dalšího výzkumu.

4. Složení stresových granulí

Všech 144 proteinů, které byly nalezeny ve stresových granulích je uvedeno v Tabulce 1, spolu se stresovým faktorem, který tvorbu SG indukoval. Pro větší přehlednost jsou stresové faktory v tabulce rozděleny do dvou skupin: faktory indukující tvorbu SG přes fosforylaci eIF2 α a faktory na této fosforylaci nezávislé.

Proteiny přítomné ve stresových granulích můžeme rozdělit do několika skupin, podle jejich funkce:

1. proteiny, které jsou součástí translačního iniciačního komplexu
2. RNA vazebné proteiny ovlivňující strukturu, stabilitu a funkci mRNA
3. proteiny podílející se na transkripci
4. RNA helikázy
5. proteiny podílející se na degradaci mRNA
6. proteiny podílející se na posttranslačních modifikacích
7. signální proteiny
8. proteiny podílející se na umlčování genů pomocí miRNA
9. chaperony a jejich ko-chaperony
10. ostatní - proteiny molekulárních motorů, proteiny zajišťující jaderný transport, aj.

Některé proteiny jsou součástí SG indukovaných pouze některými stresovými faktory. Například protein tepelného šoku B1 (HspB1) se vyskytuje pouze ve stresových granulích indukovaných vysokou teplotou a chybí v SG indukovaných arsenitanem nebo UV zářením (Kedersha *et al.* 1999). Protein CASC3 je naopak přítomen pouze v SG indukovaných arsenitanem nebo thapsigarginem, ale nikoli vysokou teplotou (Baguet *et al.* 2007; Didiot *et al.* 2009). Ačkoli všechny tyto stresové faktory vedou k fosforylaci eIF2 α , stresová reakce buněk se zřejmě v některé fázi liší a vede k tvorbě stresových granulí s rozdílným složením.

V některých případech se autoři na lokalizaci proteinu do SG neshodují. Příkladem je TAR DNA vazebný protein (TDP-43), který byl během jednoho experimentu nalezen v SG indukovaných arsenitanem (McDonald *et al.* 2011), ale během jiného experimentu prováděného na stejné buněčné línii za použití stejného stresového faktoru byl ze stresových granulí vyloučen (Bentmann *et al.* 2012). V obou experimentech byly SG detekovány pomocí stejného markeru - proteinu TIA1. U jiných proteinů, které se při působení stejného stresového faktoru vyskytovaly v SG během jednoho experimentu, ale během jiného nikoli, může být tato neshoda dána použitím rozdílných buněčných linií. Například eIF-4G je přítomen v SG indukovaných peroxidem vodíku v HeLa buňkách, ale nikoli v U-2 OS buňkách (Brown *et al.* 2011; Emara *et al.* 2012).

Pomocí siRNA interference, popř. použitím buněčné linie s odstraněným či nefunkčním genem pro určitý protein lze zjistit, jestli je tento protein důležitý pro správné skládání SG. Zdá se, že žádný protein není

pro skládání SG esenciální. Umlčením, popř. vymazáním genů pro celou řadu proteinů nalezených v SG lze snížit počet SG v buňce, jejich velikost, případně rychlost skládání, ale nikdy není jejich tvorba zcela znemožněna. To platí i v případě hlavních agregačních proteinů - G3BP-1, G3BP-2, TIA1 a TIAR. Snížení exprese genu pro G3BP-1 pomocí siRNA vedlo k redukci počtu buněk obsahujících SG po působení arsenitanu z původních 80% na 40% (Matsuki *et al.* 2013), případně znemožnilo splývání malých granulí ve větší (tzv. sekundární agregace) (Aulas *et al.* 2012). Poněkud mírnější redukce počtu SG⁺ buněk byla pozorována po transfekci siRNA cílené proti genu kódujícímu G3BP-2 (z původních 80% SG⁺ buněk na 50%). Zajímavé je, že transfekce obou těchto siRNA současně vedla k výrazné redukci SG⁺ buněk (<10%). Je zřejmé, že se oba tyto proteiny synergisticky podílejí na skládání SG a při absenci pouze jednoho z nich je tvorba SG zachována (Matsuki *et al.* 2013). Podobně se mohou navzájem zastoupit i proteiny TIA1 a TIAR. Myší embryonální fibroblasty s odstraněným genem pro TIAR (MEF KO TIAR) tvořily po působení arsenitanu nebo vysoké teploty dokonce více SG, než buňky produkující TIAR v normální míře. Tento nečekaný jev může být vysvětlen zvýšenou produkcí TIA1, kterou buňky kompenzují ztrátu proteinu TIAR (Dang *et al.* 2006; Gilks *et al.* 2004). Autoři se neshodují na tom, do jaké míry je pro tvorbu SG klíčová přítomnost TIA1 v buňce. Při experimentech s MEF buněčnou linií s odstraněným genem pro TIA1 (MEF KO TIA1) se v jednom případě po působení arsenitanu a DMDA-PatA tvořily menší SG (Dang *et al.* 2006), jindy byly SG po působení arsenitanu nebo vysoké teploty tvořeny pouze minoritní částí buněk (Gilks *et al.* 2004) a v dalších případech byla dokonce tvorba SG indukovaných arsenitanem (De Leeuw *et al.* 2007) nebo 15d-PGJ2 (Kim *et al.* 2007) oproti kontrolním buňkám nezměněna. Není jasné, jestli je za částečnou schopnost MEF KO TIA1 buněk tvořit SG zodpovědný protein TIAR, nebo některý z dalších agregačních proteinů.

Je možné, že různé agregační proteiny jsou důležité pro tvorbu SG indukovanou různými stresovými faktory. Působení arsenitanu vede k defosforylaci G3BP-1 a ten je potom schopný agregovat a tvořit SG. Fosforylovaný G3BP-1 tuto schopnost nemá. Není proto překvapivé, že zvýšená produkce fosfomimetického mutantního G3BP-1 (S149E) nevede k indukci SG, ačkoli zvýšená produkce jeho normální varianty ano. Zajímavé je, že ne všechny SG indukované nadprodukcí G3BP-1 obsahují TIA1 nebo TIAR proteiny, což nasvědčuje tomu, že tyto nejsou pro skládání některých SG esenciální. Jiné stresové faktory, které nevedou k defosforylaci G3BP-1, zřejmě indukují tvorbu SG pomocí TIA1/R nebo jiných agregačních proteinů. V tomto případě může být fosforylovaný G3BP-1 směřován do SG pomocí své RNA vazebné domény, ale nepodílí se aktivně na agregaci RNP částic uvolněných z rozpadajících se polyzomů (Tourriere *et al.* 2003). Bylo by zajímavé vědět, jaký vliv by mělo působení některého faktoru, který nevede k defosforylaci G3BP-1, na buňky deficitní pro TIA1 a TIAR proteiny. O odstranění TIA1 a TIAR pomocí siRNA interference se pokoušeli již Gilks *et al.*, ale buňky bohužel nebyly po takovém zásahu životaschopné (Gilks *et al.* 2004). Není jasné, jestli byla jejich smrt způsobena neschopností tvořit SG, nebo narušením jiných procesů, na kterých se TIA1/R proteiny podílí (např. sestřih pre-mRNA).

Vedle agregačních proteinů jsou i některé další proteiny funkčně důležité pro skládání SG indukovaných pouze určitým stresovým faktorem. Například potlačení exprese genu kódujícího eukaryotní

translační iniciační faktor 5A (eIF-5A) pomocí siRNA v U-2 OS buňkách vedlo k výrazné redukci počtu buněk tvořících SG po působení arsenitanu nebo thapsigarginu, ale nemělo vliv na tvorbu SG indukovaných pateaminem A nebo clotrimazolem (Li *et al.* 2010). Iniciační faktor eIF-4E se naopak podílí pouze mírně na tvorbě SG indukovaných arsenitanem, jeho odstranění má ovšem za následek značnou redukci počtu SG⁺ buněk po působení peroxidu vodíku (Emara *et al.* 2012). Serin/threonin protein kináza SMG1 (SMG-1) je důležitá pro tvorbu SG indukovaných arsenitanem a peroxidem vodíku, ale nikoli pro SG indukované vysokou teplotou (Brown *et al.* 2011).

Stresové granule vznikají multimerizací agregačních proteinů, které vážou nepřekládané molekuly mRNA. Aby se protein dostal do SG, musí být tedy navázaný na mRNA, případně interagovat s proteinem, který se na ni váže. V SG by se tudíž měly nacházet takové součásti iniciačního komplexu, jejichž interakce s mRNA (ať už přímá či nepřímá přes jiný protein) je na inhibovaném kroku skládání iniciačního komplexu nezávislá. Překvapivě tomu tak, navzdory poměrně logickému předpokladu, není. V roce 2012 byl nastíněn nový mechanismus indukce SG působením peroxidu vodíku a seleničitanu, který brání vzniku iniciačního komplexu hypofosforylací 4E-BP a jeho následnou vazbou na eIF-4E (viz kapitola 3.2.3). Stresové granule vznikající tímto způsobem se svým složením liší od SG indukovaných ostatními mechanismy a z tohoto důvodu jsou autory označovány jako nekanonické (Emara *et al.* 2012; Fujimura *et al.* 2012). V SG indukovaných peroxidem vodíku chybí eIF-4E, eIF-4G, eIF3 a PABP-1. Iniciační faktor eIF-4E je při působení H₂O₂ transportován do jádra a je tím znemožněno sestavení eIF-4F komplexu, což vysvětluje absenci eIF-4E a eIF-4G v SG (Emara *et al.* 2012). Nečekaná byla zejména absence eIF3, jelikož byl tento iniciační faktor do té doby považován za jeden z hlavních markerů stresových granulí. Při indukci SG mechanismem závislým na fosforylaci eIF2 α není skládání eIF-4F komplexu blokováno a interakce eIF-4G, který je součástí tohoto komplexu a eIF3 by mohla být důvodem, proč je eIF3 směřován do SG, i když je inhibováno připojení preiniciačního komplexu k mRNA (Villa *et al.* 2013). Absence eIF-4G v SG indukovaných hydroxidem by tedy mohla vysvětlovat i absenci eIF3. Proč není PABP-1 součástí těchto SG neumím vysvětlit. V SG indukovaných seleničitanem chybí eIF3, ale všechny součásti eIF-4F komplexu i PABP-1 jsou přítomny (Fujimura *et al.* 2012). Jakým způsobem se dostávají eIF-4G a eIF-4A do SG, když by měla být tvorba eIF-4F komplexu na mRNA znemožněna vazbou 4E-BP na eIF-4E není jasné.

Některé proteiny nalezené ve stresových granulích jsou jejich součástí, pouze pokud jsou správně posttranslačně modifikované. Ve stresových granulích indukovaných arsenitanem bylo objeveno velké množství glykosylovaných proteinů a potlačení exprese genů kódujících enzymy funkčně důležité pro glykosylaci vedlo k silné inhibici SG (Ohn *et al.* 2008). Další posttranslační modifikací, která hraje důležitou roli při skládání SG je fosforylace, popř. defosforylace. Vedle fosforylace eIF2 α , která je indukována velkým množstvím stresových faktorů aktivujících různé kinázy, je tato modifikace důležitá i pro další proteiny nalezené v SG. Působení arsenitanu vede k aktivaci p38 mitogenem aktivované protein kinázy (p38-MAPK), která následně fosforyluje TTP, což vede k jeho vazbě na 14-3-3 protein a vyloučení ze stresových granulí. K aktivaci p38-MAPK nedochází při působení karbonyl kyanid(trifluoromethoxy)fenylhydrazonu (FCCP) nebo při nadprodukci TTP vyvolané tranzientní transfekcí, což jsou stresové faktory, během kterých byl TTP

nalezen v SG (Rigby *et al.* 2005; Stoecklin *et al.* 2004). Agregací protein G3BP-1 musí být v defosforylovaném stavu (konkrétně jeho serin na pozici 149), aby mohl agregovat a tvořit SG (Tourriere *et al.* 2003). Methylace RGG domény proteinu mentální retardace způsobené fragilním X (FMRP) je důležitá pro tvorbu SG indukovaných arsenitanem a pro směřování FMRP do těchto SG (viz kapitola 5.3.2.) (Dolzhanskaya *et al.* 2006a). Mezi další posttranslační modifikace, které hrají roli při skládání či regulaci SG patří acetylace (Ohn *et al.* 2008), hypusinace (Li *et al.* 2010), ubikvitinylace (Kwon *et al.* 2007; Mazroui *et al.* 2007) nebo ADP-ribosylace (Leung *et al.* 2011).

Tabulka 1: Proteiny nalezené ve stresových granulích v lidských buněčných liniích.

Uniprot Short/Entry name	Uniprot ID	Funkčně důležitý pro skládání SG?	Nadprodukce vede ke skládání SG?	Stresové faktory indukující tvorbu SG mechanismem		Za těchto stresových faktorů není v SG	Funkce	Poznámka
				závislým na fosforylaci eIF2 α	nezávislým na fosforylaci eIF2 α			
14-3-3	-	-	-	$\uparrow$ MEX3B ¹	-	-	adaptorový protein signálních drah	-
4E-T	Q9NRA8	-	-	HS ²	-	H ₂ O ₂ ³⁹	jaderný import eIF-4E	-
ABC3G	Q9HC16	-	-	AS ³ ; HS ⁴	-	-	antivirální faktor	-
AHSA2	Q719I0	-	-	-	HIPP ⁸	-	ko-chaperon HS90	-
AKAP-9	Q99996	ano ⁹	-	AS, HS ⁹	-	-	adaptorový protein signálních drah	-
Angiogenin	P03950	-	-	AS ¹⁰	-	-	ribonukleáza	-
Argonaute1	Q9UL18	-	-	AS ⁵ ; HS ⁴	HIPP ⁵	-	RNA zprostředkované umlčování genů	-
Argonaute2	Q9UKV8	-	-	AS ⁵ ; HS ⁴ ; THAP ⁶	HIPP ⁵ ; SE ⁷	-	RNA zprostředkované umlčování genů	-
Argonaute3	Q9H9G7	-	-	AS ⁵	HIPP ⁵	-	RNA zprostředkované umlčování genů	-
Argonaute4	Q9HCK5	-	-	AS ⁵	HIPP ⁵	-	RNA zprostředkované umlčování genů	-
ATX2	Q99700	ano ^{11,12}	ne ^{11,12}	AS ¹¹ ; HS, OS, DTT ¹²	H ₂ O ₂ , SE ¹²	-	signální dráha EGFR	-
ATX2L	Q8WWM7	ano ¹²	ano ¹²	AS, HS, OS, DTT ¹²	H ₂ O ₂ , SE ¹²	-	funkce není známa	-
CAPR1	Q14444	ne* ¹⁴	ano ¹⁴	AS ¹⁴ ; HS ⁹	-	-	regulace transportu mRNA a translace	* DT40
CASC3	O15234	ano ⁵⁴	ne ⁵⁴	AS, THAP ⁵⁴	-	HS ⁵²	sestřih pre-mRNA	-
CCAR1	Q8IX12	ano ⁹	-	AS, HS ⁹	-	-	regulace transkripce; regulace apoptózy	-
CD24	P25063	-	-	AS ¹⁵	-	-	protein signální dráhy	-
CD37L	Q7L3B6	-	-	-	HIPP ⁸	-	ko-chaperon HSP70 a HS90	-
CDC37	Q16543	-	-	-	HIPP ⁸	-	ko-chaperon HS90	-
CELF-1	Q92879	-	-	AS, HS, FCCP, DTT ¹⁶	-	-	sestřih pre-mRNA; regulace translace; stabilita mRNA	-
CHSP1	Q9Y2V2	-	-	AS ⁷²	-	-	stabilita mRNA	-

Uniprot Short/Entry name	Uniprot ID	Funkčně důležitý pro skládání SG?	Nadprodukce vede ke skládání SG?	Stresové faktory indukující tvorbu SG mechanismem		Za těchto stresových faktorů není v SG	Funkce	Poznámka
				závislým na fosforylaci eIF2 α	nezávislým na fosforylaci eIF2 α			
CIRBP	Q14011	-	ano ^{*17}	AS ¹⁷	-	-	regulace translace	* COS-7
CPE-BP1	Q9BZB8	-	ano ¹⁸	AS ¹⁸	-	-	regulace translace	-
DAZP2	Q15038	ano ¹⁹	ano ¹⁹	AS, HS ¹⁹	-	-	regulace translace	-
DCP1	-	-	-	↑CPEB1 ¹⁸	-	-	degradace mRNA	-
DDX1	Q92499	-	-	AS ²⁰	-	-	RNA helikáza	-
DDX3X	O00571	ano ^{*21,22}	ano ²¹	AS, HS ²¹ ; OS, UV, DTT ²²	-	-	RNA helikáza	* pro SG induk. OS
DDX6	P26196	-	-	AS ¹⁸ , HS ⁴	-	-	RNA helikáza, degradace mRNA	-
DHX36	Q9H2U1	ne ²⁴	-	AS, HS, CCCP ²⁴	HIPP ²⁴	-	RNA helikáza, degradace mRNA	-
DISC1	Q9NRI5	-	ano ²⁵	-	-	AS, -Glc ²⁵	protein vícero signálních drah	-
DRADA	P55265	-	-	AS ²⁶	-	-	adenosin deamináza	-
DYHC	-	ano ^{*23}	-	AS ²³	-	-	molekulární motor	* NIH/3T3
DYL	-	-	-	AS ²³	-	-	molekulární motor	-
DYRK3	O43781	ne ²⁷	-	AS, OS ²⁷	-	-	kináza	-
E2AK1	Q9BQI3	-	-	AS ²⁸	-	-	eIF2 α kináza	-
eIF-2A	P05198	-	-	AS ^{*29} ; TUN, -Fe, HYP ³⁰	DMDA-PatA ^{*31} ; CS ^{*32}	AS ²⁹	translační iniciační faktor	* fosforylovaný; MEF; COS-7
eIF3	-	ano ³³	-	AS ²⁹ , HS ¹³ , FCCP, OLG, 2DG ²⁹ , THAP ⁶ ; -Glc ²⁵ ; CLT ¹³ , TUN, -Fe, HYP ³⁰	H ₂ O ₂ ³⁴ ; HIPP ³⁵ , PatA ³⁶ , DMDA-PatA ³¹ ; 15d-PGJ2 ³⁷ ; CS ³² ; 5'-tiRNA ³⁸	H ₂ O ₂ ³⁹ ; SE ⁷	translační iniciační faktor	-
eIF-4A	-	-	-	AS ³¹ ; HS ⁴⁰ ; MG132 ⁴¹	HIPP, PatA, DMDA-PatA ³¹ ; SE ⁷	-	translační iniciační faktor	-
eIF-4B	P23588	-	-	AS ³¹	DMDA-PatA ³¹	-	translační iniciační faktor	-
eIF-4E	P06730	ano ^{*39,42}	-	AS ²⁹ , HS ¹³ ; OS ²² ; THAP ⁴³ ; CLT ¹³ ; BRTZ ⁴⁴	DMDA-PatA ³¹ ; SE ⁷	H ₂ O ₂ ³⁹	translační iniciační faktor	* pro SG induk. H ₂ O ₂
eIF-4G 1	Q04637	ano ⁴²	-	AS ²⁹ ; HS, PUR ⁴⁰	H ₂ O ₂ ⁴⁵ ; 15d-PGJ2 ³⁷ ; CS ^{*32} ; SE ⁷	H ₂ O ₂ ³⁹	translační iniciační faktor	* COS-7
eIF-4G 2	P78344	-	-	AS, HS ⁴⁶	-	-	translační iniciační faktor	-
eIF-5A*	-	ano ^{*47}	-	AS, HS, CLT ⁴⁷		AS ²⁹ ; SE ⁷	translační iniciační faktor	* COS-7; pro SG induk. AS a THAP

Uniprot Short/Entry name	Uniprot ID	Funkčně důležitý pro skládání SG?	Nadprodukce vede ke skládání SG?	Stresové faktory indukující tvorbu SG mechanismem		Za těchto stresových faktorů není v SG	Funkce	Poznámka
				závislým na fosforylaci eIF2 α	nezávislým na fosforylaci eIF2 α			
ELAV4	P26378	-	-	HS ⁴⁸	-	-	stabilita mRNA	-
EWS	Q01844	ne ⁴⁹	ne* ⁵⁰	AS, HS ⁵⁰	-	-	RNA vazebný protein; regulace transkripce	* < 1% SG+ buněk
FAST kinase	Q14296	-	-	AS ¹³ ; HS ⁵¹	-	-	kináza	-
FMRP	Q06787	ano ⁵²	ano ⁵³	AS ¹¹² ; HS ⁵³ ; OS ⁵⁵ ; PUR ⁵² ; MG132 ⁴¹ ; THAP ⁵⁴ ; BRTZ ⁴⁴	HIPP, PatA ³¹ ; SE ⁷ ; NSC ⁵⁶	-	RNA vazebný protein (autoagregující)	-
FUS	P35637	ne ^{57,49}	ano ⁵⁰	AS, HS ⁵⁰ ; OS ⁵⁸ ; THAP ⁵⁹ ; M9M ⁶⁰	-	AS, HS, THAP ⁵⁸ ; CLT ⁶¹ ; H ₂ O ₂ ⁵⁸	RNA vazebný protein	-
FXR1	P51114	-	-	AS ¹¹² ; HS ⁵³ ; MG132 ⁴¹ ; BRTZ ⁴⁴	H ₂ O ₂ ³⁹ ; DMDA-PatA ³¹ ; NSC ⁵⁶	-	RNA vazebný protein (autoagregující)	-
FXR2	P51116	-	-	HS ⁵³	-	-	RNA vazebný protein (autoagregující)	-
G3BP-1	Q13283	ano ^{62,57}	ano ⁶³	AS ⁶³ ; HS, OS ⁶⁴ ; UV ⁶⁵ ; MG132 ⁴¹ ; THAP ⁵⁹ ; CCCP ⁶⁵ ; M9M ⁶⁰ ; BRTZ ⁴⁴ ; DEM ⁶⁶	H ₂ O ₂ ³⁹ ; HIPP, PatA ³¹ ; CS* ³² ; SE ⁷ ; NSC ⁵⁶ ; 5'-tRNA ³⁸	-	RNA vazebný protein (autoagregující)	* COS-7
G3BP-2	Q9UN86	ano ⁶²	ano ⁶²	AS ⁶² ; HS ⁶⁷	-	-	RNA vazebný protein (autoagregující)	-
GBLP	P63244	-	-	AS ³³	-	SE ⁷	40S podjednotka ribozomu	-
HD6	Q9UBN7	ano* ⁶⁵	-	AS, HS, UV, CCCP ⁶⁵	-	SE ⁷	deacetyláza	* MEF
hnRNP A1	P09651	-	-	AS, HS, OS ⁶⁴	-	AS* ⁶⁸ ; $\uparrow$ FMRP ⁵³ ; $\uparrow$ G3BP-1 ⁶⁴	sestřih pre-mRNA; transport mRNA; regulace translace; stabilita mRNA	* COS-7
hnRNP A2/B1	P22626	-	-	AS ⁶⁹	-	-	úprava pre-mRNA	-
hnRNP Q	O60506	-	-	AS, HS, THAP ⁷⁰	-	-	sestřih pre-mRNA; transport mRNA; regulace translace; stabilita mRNA	-
HS90	-	-	-	-	HIPP ⁸	-	chaperon	-
HspB1	P04792	ne ⁶⁸	-	HS ⁶⁸	15d-PGJ2 ³⁷	AS, UV ⁶⁸	uplatňuje se v odolnosti vůči stresu	-
HuR	Q15717	-	-	AS ²⁹ ; HS ⁴⁸ ; OS ⁷¹ ; MG132 ⁴¹ ; BRTZ ⁴⁴ ; DEM ⁶⁶	H ₂ O ₂ ³⁹ ; HIPP, PatA ³¹ ; 15d-PGJ2 ³⁷ ; CS* ³² ; SE ⁷ ; NSC ⁵⁶	-	stabilita mRNA; regulace sestřihu pre-mRNA	* COS-7
IHABP-4*	Q5JVS0	-	-	AS ⁸¹	-	-	regulace transkripce	* COS-7

Uniprot Short/Entry name	Uniprot ID	Funkčně důležitý pro skládání SG?	Nadprodukce vede ke skládání SG?	Stresové faktory indukující tvorbu SG mechanismem		Za těchto stresových faktorů není v SG	Funkce	Poznámka
				závislým na fosforylaci eIF2α	nezávislým na fosforylaci eIF2α			
IMP-1	Q9NZI8	ne ⁷³	ne ⁷³	AS, HS ⁷³	-	-	regulace translace; transport mRNA	-
IMP-2	Q9Y6M1	-	-	AS ⁷⁴	-	-	regulace translace; transport mRNA	-
IMP-3	O00425	-	-	AS ⁷⁴ ; HS ⁶⁷	-	-	regulace translace; transport mRNA	-
IMA1	P52292	ano ^{*75}	-	AS, HS ⁷⁵ ; DEM ⁶⁶	HIPP ⁷⁵	SE ⁷	jaderný import	* opožděná tvorba SG
IMA4	O00505	-	-	AS, HS, DEM ⁶⁶	-	-	jaderný import	-
IMA5	P52294	-	-	AS, HS, DEM ⁶⁶	-	-	jaderný import	-
IMB1	Q14974	-	-	AS ⁷⁶ ; HS, DEM ⁶⁶	-	SE ⁷	jaderný import	-
Imp8	O15397	-	-	AS ⁷⁷	-	-	jaderný import	-
IPPK	Q9H8X2	-	ano ⁷⁸	PUR ⁷⁸	-	-	kináza	-
JNK*	-	-	-	↑TIA-1, ↑TTP ⁷⁹	-	AS, HS, ↑G3BP-1 ⁷⁹	kináza	* fosforylovaný
KINH	-	ne ^{*23}	-	AS ²³	-	-	molekulární motor	* NIH/3T3
KHDR1	Q07666	ne ⁸⁰	-	AS ⁸⁰	-	↑FMRP ⁵³	regulace translace	-
KLC	-	ne ^{*23}	-	AS ²³	-	-	molekulární motor	* NIH/3T3
L1ORF1p	Q9UN81	-	-	OS, THAP ⁶	-	-	retrotranspozon	-
LAR4B	Q92615	-	-	AS ⁸³	-	-	regulace translace	-
Lin-28A*	Q9H9Z2	-	-	HS ⁸⁴	-	-	regulace translace	* P19
LS14	-	-	-	AS ⁸⁵	-	-	?*	* závisí na homologu
MABP1	O60336	-	-	AS ⁸⁶	-	-	signální dráha JNK	-
MBNL1	Q9NR56	-	-	AS, HS ²⁰	-	-	regulace sestřihu pre-mRNA	-
MEX3B	Q6ZN04	-	ano ¹	-	-	-	RNA vazebný protein	-
MOV10	Q9HCE1	-	-	HS ⁴ ; THAP ⁶	-	-	RNA helikáza; RNA zprostředkované umlčování genů	-
MTOR	P42345	ano ⁴²	-	AS, OS ²⁷	-	AS, BRTZ ⁴²	kináza	-
NCoA-3	Q9Y6Q9	-	-	AS ³⁶	-	-	regulace transkripce	-

Uniprot Short/Entry name	Uniprot ID	Funkčně důležitý pro skládání SG?	Nadprodukce vede ke skládání SG?	Stresové faktory indukující tvorbu SG mechanismem		Za těchto stresových faktorů není v SG	Funkce	Poznámka
				závislým na fosforylaci eIF2 α	nezávislým na fosforylaci eIF2 α			
NXF1	Q9UBU9	-	-	$\uparrow$ DDX3X ²¹	-	-	jaderný export mRNA	-
OGFD1	Q8N543	ne ²⁸	ne ²⁸	AS, THAP ²⁸	-	-	regulace fosforylace eIF2 α	-
OGG1	O15527	-	-	CD ⁸⁷	-	-	oprava DNA	-
OGT1	O15294	-	-	AS ³³	-	CLT ³³	glykosylace	-
PABP-1	P11940	ne ²²	-	AS ⁶⁸ ; HS ⁵³ ; OS ⁶⁴ ; UV ²² ; MG132 ⁴¹ ; THAP ⁶ ; DTT ²² ; M9M ⁶⁰	DMDA-PatA ³¹ ; 15d-PGJ2 ³⁷ ; CS ^{*32} ; SE ⁷	H ₂ O ₂ ³⁹	iniciace translace	* COS-7
PABP-4	Q13310	-	-	AS, UV ⁸⁸	-	-	polyA vazebný protein	-
PAIRB	Q8NC51	-	-	AS ⁵⁵ ; THAP ⁶	-	-	stabilita mRNA	-
PARG	Q86W56	ne ³⁵	ne ^{*35}	AS ³⁵	-	-	glykohydroláza	* $\uparrow$ vede k inhibici SG
PARP-12	Q9H0J9	-	ano ³⁵	AS ³⁵	-	-	poly [ADP-ribóza] polymeráza	-
PARP-13.1	-	-	ano ³⁵	AS ³⁵	-	-	poly [ADP-ribóza] polymeráza	-
PARP-13.2	-	-	ano ³⁵	AS ³⁵	-	-	poly [ADP-ribóza] polymeráza	-
PARP-14	Q460N5	-	ano ³⁵	AS ³⁵	-	-	poly [ADP-ribóza] polymeráza	-
PARP-15	Q460N3	-	ano ³⁵	AS ³⁵	-	-	poly [ADP-ribóza] polymeráza	-
PCBP2	Q15366	ne ⁸⁹	-	AS, HS, DTT ⁸⁹	SE ⁷	-	poly(rC) vazebný protein	-
PHB2	Q99623	ano ³³	-	AS ³³	-	-	regulace transkripce	-
PKC-A	P17252	ano ^{*67}	-	AS, HS ⁶⁷	-	-	kináza	* opožděná tvorba SG
PKP1	Q13835	-	-	HS ⁹⁰	-	-	buněčná adheze	-
PKP3	Q9Y446	-	-	AS, HS ⁹⁰	-	-	buněčná adheze	-
PQBP-1*	O60828	-	ne ^{*91}	AS ⁹¹	-	-	regulace transkripce	* F11; $\uparrow$ vede k inhibici SG
PRKRA	O75569	-	-	-	HIPP ⁸	-	aktivace eIF2 α kinázy	-
Pumilio-1	Q14671	ne ⁵¹	-	AS, HS ⁵¹	-	-	regulace translace	-
Pumilio-2	Q8TB72	ano ^{*92}	ano ⁹²	AS ⁹²	-	-	regulace translace	* kryší neurony

Uniprot Short/Entry name	Uniprot ID	Funkčně důležitý pro skládání SG?	Nadprodukce vede ke skládání SG?	Stresové faktory indukující tvorbu SG mechanismem		Za těchto stresových faktorů není v SG	Funkce	Poznámka
				závislým na fosforylaci eIF2 α	nezávislým na fosforylaci eIF2 α			
QKI-6	Q96PU8	-	-	AS ⁹³	-	-	sestřih pre-mRNA; transport mRNA; regulace translace; stabilita mRNA	-
QKI-7	Q96PU8	-	-	AS ⁹³	-	-	sestřih pre-mRNA; transport mRNA; regulace translace; stabilita mRNA	-
RAN	P62826	-	-	AS ⁷⁵	-	-	jaderný import/export	-
Raptor	Q8N122	ne ³⁴	-	AS, OS ²⁷	H ₂ O ₂ ³⁴	-	signalizace pomocí mTORC1	-
RBM4	Q9BWF3	-	-	AS ⁹⁴	-	-	sestřih pre-mRNA; regulace translace	-
RBP56	Q92804	ne ⁴⁹	ano ⁵⁰	AS, HS ⁵⁰	-	-	regulace transkripce	-
RC3H2	Q9HBD1	-	ano ⁹⁵	AS ⁹⁵	-	-	regulace translace; degradace mRNA	-
RENT1	Q92900	-	-	AS, HS ⁴⁵	H ₂ O ₂ ⁴⁵	-	degradace mRNA	-
RNase H1	O60930	ne ¹⁰	-	AS ¹⁰	-	-	degradace mRNA	-
RNaseP protein p20	O75817	-	-	HS, UV ⁹⁶	-	-	dozrávání tRNA	-
Roquin	Q5TC82	-	ano ⁹⁵	AS ⁹⁵	-	-	regulace translace; degradace mRNA	-
RS19	P39019	-	-	AS ²⁹	-	-	40S podjednotka ribozomu	-
RS3	P23396	-	-	AS ²⁹	-	-	40S podjednotka ribozomu	-
RS3a	P61247	-	-	AS ²⁹	-	-	40S podjednotka ribozomu	-
RS6	P62753	-	-	AS ³¹	DMDA-PatA ³¹ ; 15d-PGJ2 ³⁷	-	40S podjednotka ribozomu	-
S6K-alpha-3	P51812	ano ⁸²	-	AS, -sérum ⁸²	SE ⁷	-	kináza	-
SIR6	Q8N6T7	-	-	AS, HS ⁹⁷	-	-	deacetyláza	-
Smaug 1	Q9UPU9	-	ano ⁹⁸	-	-	-	regulace translace	-
SMG-1	Q96Q15	ano* ⁴⁵	-	AS*, HS ⁴⁵	H ₂ O ₂ ⁴⁵	AS ⁴⁵	kináza	* pro SG induk. AS a H ₂ O ₂ ; NFF
SMN	Q16637	ano* ⁹⁹	ano ⁹⁶	HS, UV ⁹⁶ ; CD ⁸⁷	-	-	sestřih pre-mRNA; RNA vazebný protein (autoagregující)	* P19
SND1	Q7KZF4	ano* ¹⁰⁰	-	AS, HS ¹⁰⁰	-	-	regulace transkripce	* sekundární agregace

Uniprot Short/Entry name	Uniprot ID	Funkčně důležitý pro skládání SG?	Nadprodukce vede ke skládání SG?	Stresové faktory indukující tvorbu SG mechanismem		Za těchto stresových faktorů není v SG	Funkce	Poznámka
				závislým na fosforylaci eIF2 α	nezávislým na fosforylaci eIF2 α			
SPAG5	Q96R06	ne ³⁴	-	AS ³⁴	H ₂ O ₂ ³⁴	-	inhibice mTORC1	-
SPS2L	Q9NUQ6	ano ¹⁰¹	-	AS, HS, UV ¹⁰¹	-	-	regulace translace	-
STAU1	O95793	ne ⁴³	ne ^{*43}	AS, THAP ⁴³	-	-	regulace translace	* ↑ vede k inhibici SG
TANK1	O95271	-	ano ³⁵	AS ³⁵	-	-	poly-ADP-ribosyltransferáza	-
TDP-43	Q13148	ano ^{69,57}	? ^{102,69,103}	AS ¹⁰⁴ ; HS ⁶⁹ ; OS ⁷¹ ; MG132 ¹⁰² ; THAP ⁶⁹	-	AS, HS, CLT ⁶¹	regulace transkripce; regulace sestřihu pre-mRNA	-
TDRD3	Q9H7E2	-	? ^{55,105}	AS, HS, OS ⁵⁵	-	-	RNA vazebný protein	-
TEBP	Q15185	-	-	-	HIPP ⁸	-	chaperon	-
TFIIIB90*	Q92994	-	-	↑G3BP-1 ¹³	-	-	transkripční faktor	* COS-7
TIA1	P31483	? ^{106,31,37,17}	ano ⁷⁵	AS, TS, OS, UV ⁶⁸ ; FCCP, OLG, 2DG ²⁹ ; PUR ⁴⁰ ; MG132 ⁴¹ ; THAP ³⁴ ; DTT ¹⁶ ; CCCP ²⁴ ; M9M ⁶⁰ ; -sérum ⁸² ; -Glc ²⁵	H ₂ O ₂ ³⁹ ; HIPP, PatA, DMDA-PatA ³¹ ; 15d-PGJ2 ³⁷ ; CS ^{*32}	-	RNA vazebný protein (autoagregující)	* COS-7
TIAR	Q01085	ne ³¹	-	AS, HS, OS, UV ⁶⁸ ; THAP ⁴³ ; M9M ⁶⁰	15d-PGJ2 ³⁷ ; SE ⁷	-	RNA vazebný protein (autoagregující)	-
TNPO1	Q92973	ne ⁷⁶	-	AS ⁷⁶	-	-	jaderný import	-
TNR6A	Q8NDV7	-	-	↑CPEB1 ¹⁸	-	-	RNA zprostředkované umlčování genů	-
TRAF2	Q12933	-	-	AS, HS, PUR ⁴⁰	15d-PGJ2 ³⁷	-	apoptóza	-
TRDMT	O14717	-	-	AS, DTT ¹⁰⁷	-	-	metyltransferáza	-
TTP	P26651	-	ano ¹⁰⁸	FCCP ¹⁰⁹	-	AS ^{*109}	degradace mRNA	* COS-7
WDR62	O43379	-	-	AS, HS ⁷⁹	-	↑G3BP-1 ⁷⁹	vývoj mozku	-
XRN1	Q8IZH2	-	-	AS ¹³	-	-	degradace mRNA	-
YBOX1	P67809	ano ¹¹⁰	ne ^{*110}	AS ¹¹¹ ; HS ⁴	-	-	sestřih pre-mRNA	* ↑ vede k inhibici SG

Tabulka 1: Proteiny nalezené ve stresových granulích v lidských buněčných liniích. V tabulce jsou uvedeny proteiny nalezené ve stresových granulích v lidských buněčných liniích. Jako název proteinu je uvedeno „short name“ z UniProtKB databáze (The UniProt Consortium 2014), popř. „entry name“, pokud není short name uvedeno v doporučených názvech proteinu. Jako identifikační číslo proteinu je použito ID proteinu z UniProtKB databáze. Pomlčka (-) ve sloupci „UniProt ID“ znamená, že protein byl v SG identifikován jako komplex, popř. není v literárním zdroji specifikováno, která podjednotka tohoto komplexu nebo který homolog/izoforma daného proteinu byl/a detekován/a, popř. daný protein není v UniProtKB databázi uveden. Pomlčka (-) v ostatních sloupcích znamená, že experiment, který by danou skutečnost zjišťoval, nebyl

proveden, popř. nebyl nalezen žádný stresový faktor daného typu (tj. indukující SG mechanismem závislým/nezávislým na fosforylaci eIF2 α), během kterého by byl daný protein nalezen v SG. Pokud byl některý protein pozorován pouze v SG indukovaných jeho vlastní nadprodukcí, je v obou sloupcích se stresovými faktory uvedena pomlčka (-). Otazník (?) znamená, že bylo provedeno více nezávislých experimentů zjišťujících danou skutečnost, ale jejich výsledky se neshodovaly. Hvězdička (*) u názvu proteinu znamená, že daný protein byl pozorován v SG v savčí buněčné linii jiné než lidské (konkrétní linie uvedena ve sloupci „Poznámka“), vždy se ovšem jedná o lidský protein. Hvězdička v ostatních sloupcích je vysvětlena ve sloupci „Poznámka“. Pokud je vysvětlením název buněčné linie, znamená to, že daný experiment byl prováděn se savčí buněčnou linií jinou než lidskou. Pokud je v jednom řádku více hvězdiček, vysvětlení ve sloupci „Poznámka“ je uvedeno ve stejném pořadí, jako hvězdičky. Šipka nahoru ($\uparrow$) znamená „nadprodukce“.

Použité zkratky stresových faktorů: **15d-PGJ2**: 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2, inhibitor iniciace translace; **2-DG**: 2-deoxyglukóza, vyvolává mitochondriální stres (inhibuje glykolýzu); **5'-tiRNA**: transfekce buněk syntetickými 5' konci stresem indukovaných malých RNA odvozených od tRNA; **AS**: arsenitan sodný, vyvolává oxidativní stres; **BRTZ**: bortezomib, inhibitor proteazomu; **CCCP**: karbonyl kyanid-m-chlorfenylhydrazon, vyvolává mitochondriální stres (inhibuje oxidativní fosforylaci); **CD**: chlorid kademnatý, vyvolává oxidativní stres; **CLT**: clotrimazol, vyvolává mitochondriální stres; **CS**: působení nízké teploty, vyvolává teplotní stres; **DMDA-PatA**: desmethyl, desamino-pateamin A, inhibitor iniciace translace; **DEM**: diethyl maleát, vyvolává oxidativní stres; **DTT**: dithiotreitol, vyvolává stres endoplazmatického retikula; **FCCP**: karbonyl kyanid(trifluoromethoxy)fenylhydrazon, vyvolává mitochondriální stres (inhibuje mitochondriální membránový potenciál); **-Fe**: odstranění železa z růstového média; **-Glc**: odstranění glukózy z růstového média; **H₂O₂**: peroxid vodíku, vyvolává oxidativní stres; **HIPP**: hippuristanol, inhibitor iniciace translace; **HS**: působení vysoké teploty, vyvolává teplotní stres; **HYP**: nedostatek kyslíku, vyvolává hypoxii; **M9M**: M9M peptid, inhibitor jaderného importu zprostředkovaného Transportinem-1; **MG132**: inhibitor proteazomu MG132; **NSC**: NSC 119893, inhibitor vazby mezi eIF2 a iniciační tRNA; **OLG**: oligomycin, vyvolává mitochondriální stres (inhibuje mitochondriální ATPázu); **OS**: hyperosmotický stres; **PatA**: pateamin A, inhibitor iniciace translace; **PUR**: puromycin, vyvolává předčasné ukončení translace, rozpad polyzomů; **SE**: seleničitan sodný, vyvolává oxidativní stres; **THAP**: thapsigargin, vyvolává stres endoplazmatického retikula; **TUN**: tunikamycin, vyvolává stres endoplazmatického retikula; **UV**: ultrafialové záření.

Použité zkratky proteinů bez UniProt ID: **14-3-3**: protein 14-3-3; **DCP1**: enzym odštěpující čepičku z mRNA 1; **DYHC**: těžký řetězec dyneinu; **DYL**: lehký řetězec dyneinu; **EGFR**: receptor epidermálního růstového faktoru; **eIF3/4A/5A**: eukaryotní translační iniciační faktor 3/4A/5A; **HS90**: protein teplotního šoku HSP 90; **HSP70**: protein teplotního šoku 70 kDa; **JNK**: c-Jun N-terminální kináza; **KINH**: těžký řetězec kinesinu; **KLC**: lehký řetězec kinesinu; **LS14**: protein LSM14; **mTORC1**: komplex savčího cíle rapamycinu 1; **PARP-13.1/13.2**: poly(ADP-ribóza) polymeráza 13.1/13.2.

Ostatní použité zkratky: **40S**: malá podjednotka ribozomu; **COS-7**: buněčná linie fibroblastů kočkodana transformovaných polyomavirem SV40; **DT40**: buněčná linie kuřecích lymfoblastů izolovaných z lymfomu; **F11**: hybridní buněčná linie odvozená z myšího neuroblastomu a krysích spinálních ganglionů; **induk.**: SG indukovány uvedeným stresovým faktorem; **MEF**: buněčná linie myších embryonálních fibroblastů; **NFF**: primární lidské fibroblasty izolované z předkožky; **NIH/3T3**: buněčná linie myších embryonálních fibroblastů; **P19**: buněčná linie myších epiteliálních buněk izolovaných z embryonálního karcinomu; **SG**: stresové granule.

Reference: 1: (Courchet *et al.* 2008); 2: (Suzuki *et al.* 2009); 3: (Kozak *et al.* 2006); 4: (Gallois-Montbrun *et al.* 2007); 5: (Leung *et al.* 2006); 6: (Goodier *et al.* 2007); 7: (Fujimura *et al.* 2012); 8: (Pare *et al.* 2009); 9: (Kolobova *et al.* 2009); 10: (Pizzo *et al.* 2013); 11: (Nonhoff *et al.* 2007); 12: (Kaehler *et al.* 2012); 13: (Kedersha *et al.* 2005); 14: (Solomon *et al.* 2007); 15: (Taniuchi *et al.* 2011); 16: (Fujimura *et al.* 2008a); 17: (De Leeuw *et al.* 2007); 18: (Wilczynska *et al.* 2005); 19: (Kim *et al.* 2008); 20: (Onishi *et al.* 2008); 21: (Lai *et al.* 2008); 22: (Shih *et al.* 2012); 23: (Loschi *et al.* 2009); 24: (Chalupnikova *et al.* 2008); 25: (Ogawa *et al.* 2005); 26: (Weissbach & Scadden 2012); 27: (Wippich *et al.* 2013); 28: (Wehner *et al.* 2010); 29: (Kedersha *et al.* 2002); 30: (Lane *et al.* 2013); 31: (Dang *et al.* 2006); 32: (Hofmann *et al.* 2012); 33: (Ohn *et al.* 2008); 34: (Thedieck *et al.* 2013); 35: (Leung *et al.* 2011); 36: (Yu *et al.* 2007); 37: (Kim *et al.* 2007); 38: (Emara *et al.* 2010); 39: (Emara *et al.* 2012); 40: (Kim *et al.* 2005); 41: (Mazroui *et al.* 2007); 42: (Fournier *et al.* 2013); 43: (Thomas *et al.* 2009); 44: (Fournier *et al.* 2010); 45: (Brown *et al.* 2011); 46: (Nousch *et al.* 2007); 47: (Li *et al.* 2010); 48: (Burry & Smith 2006); 49: (Blechingberg *et al.* 2012); 50: (Andersson *et al.* 2008); 51: (Morris *et al.* 2008); 52: (Didiot *et al.* 2009); 53: (Mazroui *et al.* 2002); 54: (Baguet *et al.* 2007); 55: (Goulet *et al.* 2008); 56: (Mokas *et al.* 2009); 57: (Aulas *et al.* 2012); 58: (Sama *et al.* 2013); 59: (Bosco *et al.* 2010); 60: (Dormann *et al.* 2010); 61: (Bentmann *et al.* 2012); 62: (Matsuki *et al.* 2013); 63: (Tourriere *et al.* 2003); 64: (Guil *et al.* 2006); 65: (Kwon *et al.* 2007); 66: (Mahboubi *et al.* 2013); 67: (Kobayashi *et al.* 2012); 68: (Kedersha *et al.* 1999); 69: (McDonald *et al.* 2011); 70: (Quaresma *et al.* 2009); 71: (Dewey *et al.* 2011); 72: (Hou *et al.* 2011); 73: (Stohr *et al.* 2006); 74: (Wachter *et al.* 2013); 75: (Fujimura *et al.* 2010); 76: (Chang & Tarn 2009); 77: (Weinmann *et al.* 2009); 78: (Brehm *et al.* 2007); 79: (Wasserman *et al.* 2010); 80: (Henao-Mejia & He 2009); 81: (Goncalves Kde *et al.* 2011); 82: (Eisinger-Mathason *et al.* 2008); 83: (Schaffler *et al.* 2010); 84: (Balzer & Moss 2007); 85: (Yang *et al.* 2006); 86: (Cohen-Katsenelson *et al.* 2013); 87: (Bravard *et al.* 2010); 88: (Burgess *et al.* 2011); 89: (Fujimura *et al.* 2008b); 90: (Hofmann *et al.* 2006); 91: (Kunde *et al.* 2011); 92: (Vessey *et al.* 2006); 93: (Wang *et al.* 2010); 94: (Lin *et al.* 2007); 95: (Athanasopoulos *et al.* 2010); 96: (Hua & Zhou 2004); 97: (Jedrusik-Bode *et al.* 2013); 98: (Baez & Boccaccio 2005); 99: (Zou *et al.* 2011); 100: (Gao *et al.* 2010); 101: (Zhu *et al.* 2008); 102: (Freibaum *et al.* 2010); 103: (Colombrita *et al.* 2009); 104: (Nishimoto *et al.* 2010); 105: (Linder *et al.* 2008); 106: (Gilks *et al.* 2004); 107: (Thiagarajan *et al.* 2011); 108: (Rigby *et al.* 2005); 109: (Stoecklin *et al.* 2004); 110: (Tanaka *et al.* 2014); 111: (Yang & Bloch 2007); 112: (Dolzhanskaya *et al.* 2006a).

5. Vybrané proteiny stresových granulí

5.1 Protein mentální retardace způsobené fragilním X (FMRP)

Protein mentální retardace způsobené fragilním X (FMRP) je RNA vazebný protein kódovaný genem *fmr1*. Tento gen se nachází v pozici 27.3 na dlouhém rameni X chromozomu (Xq27.3) a alternativním sestřihem jeho transkriptu vzniká 8 různých izoform FMRP, z nichž nejmenší (izoforma 8) má velikost 66,3 kDa a největší (izoforma 6) 71,2 kDa. Tento protein je syntetizován v různých tkáních, nejvíce ale v neuronech, mozku, varlatech, placentě a lymfocytech. Mutace ve *fmr1* genu způsobují syndrom fragilního X (FXS), což je nejčastější forma dědičné mentální retardace (shrnutí v Bardoni *et al.* 2001; Maglott *et al.* 2011; The UniProt Consortium 2014).

Blízko C konce proteinu se nachází RGG box, což je doména bohatá na tripeptidové RGG repetice (kde R značí aminokyselinu arginin a G aminokyselinu glycin). RGG box je zřejmě esenciální pro vazbu FMRP na molekulu RNA, protože zkrácená verze proteinu bez RGG boxu není schopná vázat RNA *in vitro*. Vedle RGG boxu obsahuje FMRP ještě dvě KH domény (KH1 a KH2), které byly poprvé nalezeny v heterogenním jaderném ribonukleoproteinu K (hnRNP K) a taktéž se podílí na vazbě s RNA. Mimo RNA vazebných domén jsou součástí FMRP i jaderný lokalizační signál (NLS) a jaderný exportní signál (NES) (Siomi *et al.* 1993). Při experimentu s FMRP nesoucím mutaci v jeho NES doméně (FMRP34A) byl tento protein lokalizován v cytoplazmě, ale částečně i v jádře. Z jádérka byl naopak vyloučen. Při inhibici jaderného exportu zprostředkovaného Exportinem-1 pomocí leptomycinu B (LMB) byl FMRP taktéž částečně lokalizován v jádře, ovšem do menší míry než při použití mutantního FMRP34A. Tyto výsledky naznačují, že alespoň část FMRP obsaženého v buňce migruje mezi cytoplazmou a jádrem a mohl by se tak podílet na exportu mRNA molekul z jádra do cytoplazmy, kde probíhá jejich překlad (Tamanini *et al.* 1999a).

Mechanismus funkce FMRP je i po dvaceti třech letech od objevení genu, jehož mutace jsou zodpovědné za FXS, nejasná. Přítomnost tří RNA vazebných domén v tomto proteinu napovídá, že by se mohl podílet na metabolismu RNA. Skutečně bylo zjištěno, že FMRP asociuje s polyzomy skrze jeho vazbu na mRNA a funguje jako regulátor translace (Corbin *et al.* 1997). Zajímavé je, že je schopen translaci inhibovat, ale i aktivovat (shrnutí v Maurin *et al.* 2014). Při disociaci polyzomů dochází k uvolnění RNP částic, které obsahují FMRP a jejich sedimentační koeficient je zhruba 60S (Corbin *et al.* 1997). Mezi mRNA molekulami, které FMRP váže, bylo identifikováno mnoho mRNA kódovaných geny, které souvisejí s autismem či jinými neuronálními poruchami (Ascano *et al.* 2012).

5.1.1 Klinický význam FMRP

Syndrom fragilního X postihuje téměř dvakrát častěji muže než ženy (postihuje 1/4000 mužů a 1/7000 žen), protože ženy mají dva chromozomy X a mutace na jednom z nich může být kompenzována přítomností funkčního genu na druhém. Symptomy zahrnují zejména neurologické poruchy, ale i poruchy charakteru tělesných abnormalit. Mezi neurologické poruchy spojené s FXS patří středně těžká až těžká mentální retardace ($IQ \leq 50$), poruchy motorických dovedností, poruchy řeči a problémy s chováním. Mezi nejčastější problémy s chováním patří hyperaktivita, autistické chování, snížená schopnost udržet pozornost, povrchní oční kontakt, nutková potřeba opakovaně provádět jednoduché mechanické úkony (např. tleskání) a stydlivost. Postižení jedinci mívají protáhlý obličej, odstávající uši, volné klouby, ploché nohy a u 80% postižených chlapců se vyskytuje postpubertální makroorchidismus (zvětšení varlat). Pacienti trpící syndromem fragilního X mají vysoký počet nezvykle dlouhých a zkroucených dendritických trnů. Dendritické trny jsou výčnělky na dendritech, které přijímají nervové vzruchy a vedou je dostředivě do těla neuronu. Přítomnost abnormálních dendritických trnů u pacientů s FXS naznačuje, že se FMRP podílí na jejich zrání a s ním spojené synaptické plasticitě. Doposud se výzkum zaměřoval zejména na funkci FMRP v neuronech, ale symptomy jiného než neurologického charakteru značí, že FMRP je funkčně důležitý i v jiných buněčných typech (shrnutí v Maurin *et al.* 2014).

Ve většině případů je syndrom fragilního X způsoben abnormálně vysokým počtem opakování trinukleotidového motivu CGG v nepřekládané oblasti na 5' konci *fmr1* genu. Zdravý jedinec má v této oblasti 6 - 50 těchto opakování, kdežto u jedince trpícího syndromem fragilního X převyšuje počet opakování hodnotu 200. Stav s takto vysokým počtem opakování se říká „plná mutace“. Plná mutace vzniká z tzv. premutace (60 - 200 opakování) postupnou amplifikací CGG trinukleotidů. K této amplifikaci ovšem dochází pouze při přenosu postiženého X chromozomu z matky na potomka, nikoli z otce. Riziko vzniku plné mutace závisí na délce premutace na X chromozomu přijatého od matky (méně než 5% pro alely s 60 - 65 opakováními až 100% pro alely s více než 100 opakováními). Tato amplifikace CGG trinukleotidu vede k hypermethylovanosti, umlčení transkripce tohoto genu a následné absenci FMRP. Kromě mutací vedoucích k úplné absenci FMRP (vedle expanze CGG trinukleotidu to mohou být i některé delece a bodové mutace) může být příčinou FXS i bodová mutace v KH2 doméně FMRP (výměna isoleucinu za asparagin na pozici 304), která dává vzniknout částečně funkčnímu FMRP. Protein nesoucí takovou mutaci (I304N FMRP) je i nadále schopný vázat RNA, ale není schopen tvořit homo-oligomery sám se sebou a inhibovat translaci. Zdá se, že schopnost FMRP tvořit homo-oligomery je důležitá, pro jeho správnou funkci (shrnutí v Bardoni *et al.* 2001).

5.2 Protein související s mentální retardací způsobenou fragilním X chromozomem 1 a 2 (FXR1/2)

Protein FMRP je součástí proteinové rodiny FMR1, která dále zahrnuje další dva členy - protein související s mentální retardací způsobenou fragilním X chromozomem 1 (FXR1) a 2 (FXR2) (Siomi *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1995). Protein FXR1 je kódován genem *fxr1*, který se nachází v pozici 28 na chromozomu 3 (3q28) a alternativním sestřihem jeho transkriptu mohou vzniknout tři různé izoformy proteinu, z nichž nejmenší (izoforma 3) má velikost 60 kDa a největší (izoforma 1) 69,7 kDa. Protein FXR2 má velikost 74,2 kDa a je kódován genem *fxr2*, který se nachází v pozici 13.1 na chromozomu 17 (17p13.1) (Maglott *et al.* 2011; The UniProt Consortium 2014). Všechny tři proteiny vykazují sekvenční podobnost, zejména v oblasti KH domén (až 90% identity). Naproti tomu C-koncové domény těchto proteinů vykazují nejmenší míru podobnosti. Stejně jako FMRP asociují oba FXR proteiny s polyzomy díky své vazbě na RNA (Khandjian *et al.* 1998; Siomi *et al.* 1996). Všechny jsou schopny tvořit homo-oligomery sami se sebou, ale i hetero-oligomery mezi sebou navzájem *in vitro* (Zhang *et al.* 1995). Bylo ovšem zjištěno, že naprostá většina těchto proteinů se vyskytuje v HeLa buňkách ve formě homo-oligomerů o velikosti 200 - 300 kDa (tzv. přechodné komplexy), které jsou součástí větších (cca 600 kDa) RNP částic asociovaných s polyzomy (Tamanini *et al.* 1999b). Tyto větší RNP částice obsahují polyadenylovanou mRNA, FMRP, FXR1, FXR2, protein nukleolin a další, zatím neidentifikované proteiny (Ceman *et al.* 1999). Za schopnost oligomerizovat je zodpovědná konzervovaná doména přítomná v N-koncové části proteinů (aminokyseliny na pozicích 171 - 211 ve FMRP), která není součástí KH domén ani RGG boxu (Siomi *et al.* 1996). Oligomerizace těchto proteinů je tedy nezávislá na jejich schopnosti vázat RNA. Stejně jako FMRP obsahují FXR proteiny NLS i NES (Siomi *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1995). Při experimentu s FXR2 nesoucím mutaci v jeho NES doméně, byl tento lokalizován v cytoplazmě, ale částečně i v jadérku. Naopak byl selektivně vyloučen z nukleoplazmy. Při inhibici jaderného exportu zprostředkovaného Exportinem-1 pomocí LMB byl FXR2 částečně lokalizován v jadérku a FXR1 v nukleoplazmě (Tamanini *et al.* 1999a). Tyto výsledky naznačují, že jednotlivé proteiny FMR1 rodiny se zřejmě podílejí na exportu RNA z jádra, a že by každý z nich mohl specificky exportovat jiné RNA molekuly.

5.3 Lokalizace FMR1 proteinů v buňce

FMR1 proteiny se v buňce mohou vyskytovat v podobě RNP částic asociovaných s polyzomy (viz kapitoly 5.1 a 5.2), v podobě cytoplazmatických neuronálních transportních RNP granulí (viz kapitola 5.3.1), částečně jsou lokalizovány v nukleoplazmě (FMRP a FXR1) nebo jadérku (FXR2) (viz kapitoly 5.1 a 5.2) a při buněčném stresu jsou translokovány do stresových granulí (viz kapitola 5.3.2).

5.3.1 FMR1 proteiny v neuronálních transportních RNA granulích

FMRP se podílí na transportu mRNA z těla neuronu do dendritů, konkrétně do dendritických trnů, kde dochází k jejich místně specifické translaci. Na rozdíl od stresových granulí obsahují transportní granule proteiny velké ribozomální podjednotky P0 a L28 (De Diego Otero *et al.* 2002; Villace *et al.* 2004). Na tvorbě i samotném transportu těchto granulí se podílejí mikrotubuly. Rozrušení mikrotubulů pomocí drog vede k absenci transportních granulí (De Diego Otero *et al.* 2002). Kromě FMRP byly v těchto granulích nalezeny i další proteiny, které během stresu relokalizují do SG, např. FXR1 (De Diego Otero *et al.* 2002); FXR2 (Levenga *et al.* 2009); STAU1 (Villace *et al.* 2004); PABP-1 (Villace *et al.* 2004), nebo protein malé ribozomální podjednotky RS6 (Villace *et al.* 2004). FMRP by mohl v těchto granulích fungovat jako regulátor translace, neboť překlad přenášených mRNA musí být potlačen do doby, než dojde k obdržení signálu pro místně specifickou translaci.

5.3.2 FMR1 proteiny ve stresových granulích

Všechny tři proteiny z FMR1 rodiny byly translokovány při působení některých stresových faktorů do stresových granulí (pro přehled viz Tabulka 1). Mazroui *et al.* (2002) navíc prokázali, že zvýšená produkce FMRP v HeLa buňkách indukuje skládání SG bez působení dalšího stresového faktoru. Připravil buněčnou linii STEK odvozenou od embryonální primární buněčné kultury z myši, která měla odstraněný *fmr1* gen. Buňky této linie byly transfekovány expresním vektorem nesoucím gen pro lidský FMRP. Osmnáct hodin po transfekci byl obsah buněk analyzován rychlostní sedimentací v sacharózovém hustotním gradientu a navzdory předpokladu bylo pouze 20 - 25% FMRP detekováno ve frakci spolu s polyzomy. Zbytek byl ve 12.000 g peletu, který obsahuje převážně jádra a materiál nerozpustný v neionogenních detergentech. Pomocí fluorescenčně značené protilátky bylo zjištěno, že ve 20% transfekovaných buněk se FMRP nachází v cytoplazmatických granulích spolu s polyadenylovanou mRNA, FXR2 a markery stresových granulí - TIA1, TIAR, PABP-1 a HuR. Tyto granule neobsahovaly protein velké ribozomální podjednotky L7 a působení cykloheximidu nebo emetinu vedlo k jejich rozpouštění. Všechny tři výše zmíněné charakteristiky jsou typickými znaky stresových granulí. Tranzientní transfekce HeLa buněk stejným vektorem vedla taktéž k indukci SG obsahujících FMRP.

O několik let později bylo navíc zjištěno, že FMRP je funkčně důležitý pro správnou tvorbu SG. Myší fibroblasty s nefunkčním genem pro FMRP byly vystaveny působení arsenitanu nebo vysoké teploty a tvorba SG byla pozorována pomocí fluorescenčně značené protilátky proti TIA1. V porovnání s buňkami produkujícími FMRP v normální míře byla tvorba SG ve fibroblastech neobsahujících FMRP redukována, a to zejména co se jejich intenzity týče. Buňky stabilně produkující mutantní FMRP (I304N) vykazovaly dokonce ještě horší tvorbu SG (co do počtu i intenzity SG) než buňky, ve kterých nebyl FMRP vůbec syntetizován (Didiot *et al.* 2009). Schopnost FMRP tvořit homo- i hetero-oligomery naznačuje, že by se FMRP mohl strukturně podílet přímo na agregaci RNP částic.

Dolzhanskaya *et al.* jako první demonstrovali že methylace proteinů, které jsou součástí stresových granulí, má vliv na skládání SG (Dolzhanskaya *et al.* 2006a). FMRP i FXR1 jsou kotranslačně methylovány a tato modifikace je důležitá pro jejich schopnost tvořit mezi sebou hetero-dimery. FMRP, resp. FXR1 byl

syntetizován *in vitro* v přítomnosti adenosin-2',3'-dialdehydu (AdOx), který nepřímo inhibuje aktivitu methyltransferáz a byla testována jeho schopnost tvořit hetero-dimery s FXR1, resp. s FMRP. Ukázalo se, že pro správnou tvorbu hetero-dimerů je potřeba, aby byly oba proteiny v methylovaném stavu. Schopnost těchto proteinů tvořit homo-dimery je na jejich methylaci nezávislá.

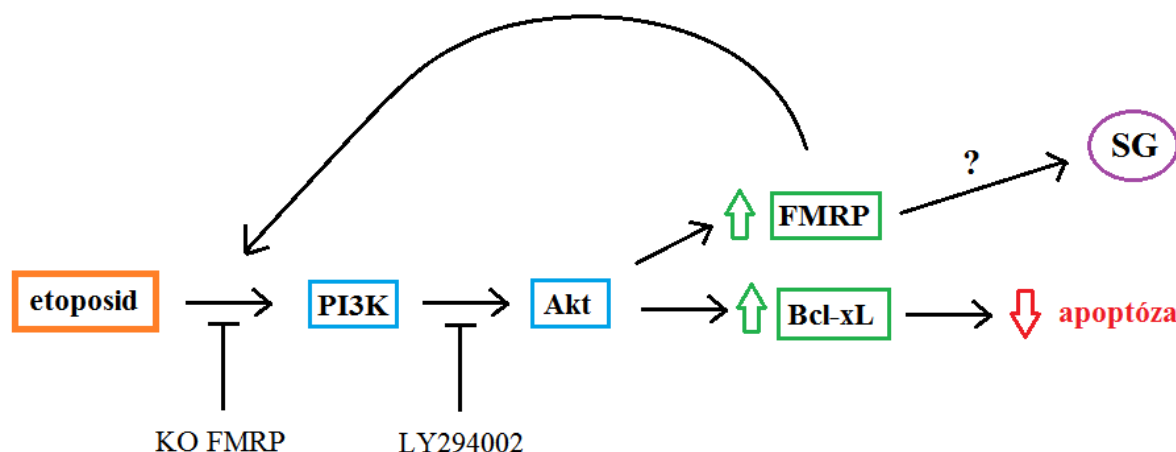
Dále bylo zjišťováno, jaký vliv má methylace těchto proteinů na jejich přesun do SG indukovaných arsenitanem v HeLa buňkách. Za normálních podmínek jsou FMRP i FXR1 asociovány převážně s polyzomy, malá část tvoří granule v cytoplazmě. Tyto granule jsou rozmístěny v cytoplazmě rovnoměrně, jsou menší než SG a neobsahují marker SG (PABP-1). Zřejmě se jedná o P-tělíska. Po působení arsenitanu naprostá většina obou proteinů (89,5% FMRP a 88% FXR1) kolokalizovala s PABP-1 ve stresových granulích tvořících se v perinukleárním prostoru. Zajímavé je, že pouze 79% FMRP⁺ stresových granulí obsahovalo FXR1. Kultivace HeLa buněk s AdOx před působením arsenitanu vedla jednak k inhibici skládání stresových granulí (30 minut po působení arsenitanu se přítomné SG jevíly menší a nebyly organizovány v perinukleárním prostoru) a jednak k tvorbě téměř dvojnásobného počtu FMRP⁺ granulí (ve srovnání s kontrolními buňkami, tj. bez působení AdOx a arsenitanu), z nichž ovšem pouze část kolokalizovala s markery SG. Množství FXR1 kolokalizujícího s PABP-1 se snížilo z 88% v buňkách stresovaných arsenitanem na 66% v buňkách kultivovaných s AdOx před přidáním arsenitanu. Tyto výsledky ukazují, že inhibice methyltransferáz interferuje s tvorbou SG. Jestli je to následek toho, že v nemethylovaném stavu nejsou FMRP a FXR1 proteiny schopné tvořit hetero-oligomery, nebo je methylace důležitá i pro jiné aspekty skládání SG, z tohoto článku nevyplývá.

Buněčná linie PC-12 je odvozena z krysí dřeně nadledvin a po působení nervového růstového faktoru (NGF) se diferencuje v buňky podobné neuronům. V diferencovaných PC-12 buňkách byly pozorovány transportní granule obsahující FMRP a to jak v těle těchto buněk, tak i v neuritech. Vystavení buněk arsenitanu indukuje tvorbu SG, které taktéž obsahují FMRP. Po vyvolání stresu dochází k přesunu veškerého FMRP v těle buněk do SG, kdežto v neuritech se takto přesune pouze 40% FMRP a zbytek FMRP zůstává součástí transportních granulí (Dolzhanskaya *et al.* 2006b). Do SG jsou transportovány RNP částice obsahující mRNA molekuly, které byly až do vyvolání stresu překládané, kdežto transportní granule migrující na konce neuritů nesou nepřekládanou mRNA, která je určena pro místně specifickou translaci. Tento fakt zřejmě vysvětluje rozdílné chování FMRP v těle buněk a neuritech po vyvolání stresu.

5.4 Úloha stresových granulí v syndromu fragilního X

Jelikož byla prokázána role FMRP ve skládání SG, dá se u pacientů s FXS předpokládat zhoršená tvorba SG a s ní spojená vyšší míra buněčné smrti při působení stresových faktorů. Jako obzvláště zajímavou považuji v této souvislosti studii Schultz-Pedersena *et al.*, kteří zjistili, že poměr výskytu rakoviny u pacientů s FXS a u běžné populace je 0,28 (Schultz-Pedersen *et al.* 2001). Rakovina je, zjednodušeně řečeno, neřízená proliferace skupiny buněk, které potlačují vlastní apoptózu. Nabízí se tedy hypotéza, že jedinci s FXS jsou

schopni nějakým způsobem kompenzovat inhibici apoptózy při rakovinném bujení. V návaznosti na tuto studii Jeon *et al.* zjistili, že přítomnost FMRP v buňce je důležitá pro aktivaci signální kaskády PI3K-Akt (PI3K, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza; Akt, protein kináza B), která vede ke zvýšené produkci antiapoptického faktoru Bcl-xL (protein podobný proteinu Bcl-2 1) (Jeon *et al.* 2011). Schematické znázornění výsledků experimentů, které jsou popsány v následujícím odstavci, je na Obrázku 3.



Obrázek 3: Schematické znázornění role FMRP v PI3K-Akt signální kaskádě. Při aktivaci PI3K-Akt signální kaskády je zvýšena produkce FMRP, který pozitivně reguluje aktivaci této kaskády a mohl by mít podíl na tvorbě stresových granulí. Zároveň je zvýšena produkce antiapoptického faktoru Bcl-xL. Nakresleno podle výsledků z publikace Jeon *et al.* (2011).

Působení etoposidu (inhibitor topozimerázy II používaný k indukci buněčné smrti) nebo peroxidu vodíku na HeLa buňky vedlo k jejich apoptóze, ale navíc i ke zvýšené fosforylaci PI3K a Akt kináz a ke zvýšené produkci FMRP a Bcl-xL. Když byla inhibována fosforylace Akt kinázy pomocí inhibitoru LY294002 během působení etoposidu, snížila se produkce Bcl-xL i FMRP a zvýšila úmrtnost buněk. Potlačení produkce FMRP vedlo k inhibici etoposidem indukované aktivace PI3K-Akt signální kaskády, snížené produkci Bcl-xL a zvýšené buněčné smrti. Zvýšená produkce FMRP v HeLa buňkách navíc vedla k jejich snížené citlivosti na etoposid a ke snížené buněčné smrti, doprovázené zvýšenou aktivací PI3K-Akt kaskády a produkcí Bcl-xL. Stručně řečeno, aby mohl etoposid aktivovat PI3K-Akt signální kaskádu, která vede ke zvýšené produkci FMRP a Bcl-xL, je třeba, aby v buňce byl přítomen funkční FMRP již před přidáním etoposidu. Zvýšená produkce FMRP indukovaná etoposidem pozitivně reguluje další aktivaci PI3K-Akt kaskády. Kromě této pozitivní regulace, by navíc mohla nadprodukce FMRP indukovat i vznik SG, které se taktéž podílí na odolnosti buněk proti stresu (Jeon *et al.* 2011).

Pacienti s FXS nesyntetizují FMRP a aktivace PI3K/Akt signální kaskády etoposidem (či jinými stresovými faktory aktivujícími tuto kaskádu) je tedy zablokována a nedochází ke zvýšené produkci Bcl-xL, což má za následek vyšší míru buněčné smrti.

6. Závěr

Tato práce se věnuje charakterizaci proteinového složení stresových granulí v lidských buněčných liniích. Od objevení stresových granulí bylo identifikováno mnoho proteinů, které jsou do nich transportovány po působení různých stresových faktorů. Většina těchto proteinů je do určité míry spjata s metabolismem mRNA, ale část z nich má funkce s mRNA zdánlivě nesouvisející. Mnoho proteinů nalezených ve stresových granulích je pro jejich skládání důležité, ať už svou fyzickou přítomností nebo svojí aktivitou, jiné jsou pro skládání SG nepodstatné a jsou do SG zřejmě přenášeny nespecificky, přes jejich vazbu na nepřekládané molekuly mRNA. Ačkoli je celá řada proteinů pro skládání SG bezesporu funkčně důležitá, žádný z nich se z dostupných informací nezdá být zcela esenciálním. Nemůžeme to však s jistotou tvrdit, neboť existují dva využívané způsoby, jak zjistit důležitost proteinu pro tvorbu SG - indukce SG v buněčné linii s odstraněným genem pro tento protein, nebo transfekce buněčné linie molekulou siRNA, komplementární ke genu kódujícímu tento protein. Ve druhém případě může být sice částečná tvorba SG po působení stresu umožněna kompenzací jeho funkce jiným proteinem (potom by tento opravdu nebyl esenciální pro tvorbu SG), ale i nedokonalým umlčením exprese genu, který ho kóduje. Pokud tedy chceme s jistotou tvrdit, že se buňka bez daného proteinu při skládání SG obejde, bylo by třeba udělat experiment s buněčnou linií, která ho vůbec nesyntetizuje. To ovšem není v mnoha případech možné, jelikož některé proteiny obsažené v SG jsou důležité pro přežití buňky i za normálních, nestresových podmínek. Nemá smysl zde vypisovat, které všechny proteiny v SG nalezeny nebyly, ale za zmínku stojí, že se v SG nikdy nevyskytují proteiny velké ribozomální podjednotky. Absence velké ribozomální podjednotky vylučuje možnost, že by SG byly místem, kde probíhá translace za stresových podmínek a odlišuje SG od transportních neuronálních granulí, které ji obsahují.

Prvním popsáním mechanismem indukce stresových granulí byla fosforylace alfa podjednotky eukaryotického translačního iniciačního faktoru 2. Od jeho objevení byly popsány další, které jsou na této fosforylaci nezávislé. Doposud posledním objeveným mechanismem nezávislým na fosforylaci eIF2 α je mechanismus objevený v roce 2012, který je vyvolán působením peroxidu vodíku nebo seleničitanu sodného a vede k hypofosforylaci eIF-4E vazebného proteinu. Zajímavé je zejména to, že složení stresových granulí se liší v závislosti na stresovém faktoru, který je vyvolává. Domnívám se, že pro pochopení toho, proč se složení stresových granulí liší, je klíčové objasnit mechanismy vedoucí k inhibici iniciace translace a tím i k indukci tvorby stresových granulí. Zjevná role stresových granulí v přežívání buněk i během působení stresových podmínek z nich dělá populární téma pro další výzkum.

Proteiny z rodiny proteinů mentální retardace způsobené fragilním X jsou studovány zejména v souvislosti se syndromem fragilního X, který je způsoben absencí nejznámějšího proteinu této rodiny, FMRP. Nalezení těchto proteinů ve stresových granulích vede k otázce, zdali mohou patologické důsledky jejich absence souviset s narušenou tvorbou stresových granulí u postižených jedinců. Tato neprobádaná oblast by mohla v budoucnu přinést užitečné poznatky o mechanismu, jakým absence FMRP vyvolává mentální retardaci, ale

i další ze symptomů syndromu fragilního X. Zajímavým zjištěním je, že se pacienti trpící syndromem fragilního X potýkají s neregulovanou proliferací buněk vedoucí k nádorům výrazně méně často, než zdraví jedinci. Je otázkou, jestli studium tohoto fenoménu povede k poznatkům, které by mohly být užitečné při vývoji medikamentů pro léčbu rakoviny.

Stresové granule jsou aktuálním tématem, které má potenciál přinášet další významné objevy. Studium stresových granulí je populární zejména pro jejich souvislost s regulací apoptózy během vystavení buněk stresovým podmínkám. Velkým přínosem pro další výzkum by byla možnost izolovat tyto granule z buněk a zkoumat jejich složení.

Seznam použité literatury

(* sekundární zdroj)

- Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, Stenman G, Nilsson O, Aman P (2008) The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol* **9**, 37.
- Ascano M, Jr., Mukherjee N, Bandaru P, Miller JB, Nusbaum JD, Corcoran DL, Langlois C, Munschauer M, Dewell S, Hafner M, Williams Z, Ohler U, Tuschl T (2012) FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* **492**, 382-386.
- Athanasopoulos V, Barker A, Yu D, Tan AH, Srivastava M, Contreras N, Wang J, Lam KP, Brown SH, Goodnow CC, Dixon NE, Leedman PJ, Saint R, Vinuesa CG (2010) The ROQUIN family of proteins localizes to stress granules via the ROQ domain and binds target mRNAs. *FEBS J* **277**, 2109-2127.
- Aulas A, Stabile S, Vande Velde C (2012) Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Mol Neurodegener* **7**, 54.
- Baez MV, Boccaccio GL (2005) Mammalian Smaug is a translational repressor that forms cytoplasmic foci similar to stress granules. *J Biol Chem* **280**, 43131-43140.
- Baguet A, Degot S, Cougot N, Bertrand E, Chenard MP, Wendling C, Kessler P, Le Hir H, Rio MC, Tomasetto C (2007) The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly. *J Cell Sci* **120**, 2774-2784.
- Balzer E, Moss EG (2007) Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. *RNA Biol* **4**, 16-25.
- * Bardoni B, Schenck A, Mandel JL (2001) The Fragile X mental retardation protein. *Brain Res Bull* **56**, 375-382.
- Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C (2012) Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem* **287**, 23079-23094.
- Blechingberg J, Luo Y, Bolund L, Damgaard CK, Nielsen AL (2012) Gene expression responses to FUS, EWS, and TAF15 reduction and stress granule sequestration analyses identifies FET-protein non-redundant functions. *PLoS One* **7**, e46251.
- Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J (2006) Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol* **2**, 213-220.
- Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ, Jr., Sapp P, McKenna-Yasek D, Brown RH, Jr., Hayward LJ (2010) Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* **19**, 4160-4175.
- Bravard A, Campalans A, Vacher M, Gouget B, Levalois C, Chevillard S, Radicella JP (2010) Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium. *Mutat Res* **685**, 61-69.
- Brehm MA, Schenk TM, Zhou X, Fanick W, Lin H, Windhorst S, Nalaskowski MM, Kobras M, Shears SB, Mayr GW (2007) Intracellular localization of human Ins(1,3,4,5,6)P5 2-kinase. *Biochem J* **408**, 335-345.
- Brown JA, Roberts TL, Richards R, Woods R, Birrell G, Lim YC, Ohno S, Yamashita A, Abraham RT, Gueven N, Lavin MF (2011) A novel role for hSMG-1 in stress granule formation. *Mol Cell Biol* **31**, 4417-4429.

- Burgess HM, Richardson WA, Anderson RC, Salaun C, Graham SV, Gray NK (2011) Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs. *J Cell Sci* **124**, 3344-3355.
- Burry RW, Smith CL (2006) HuD distribution changes in response to heat shock but not neurotrophic stimulation. *J Histochem Cytochem* **54**, 1129-1138.
- Ceman S, Brown V, Warren ST (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* **19**, 7925-7932.
- Cohen-Katsenelson K, Wasserman T, Darlyuk-Saadon I, Rabner A, Glaser F, Aronheim A (2013) Identification and analysis of a novel dimerization domain shared by various members of c-Jun N-terminal kinase (JNK) scaffold proteins. *J Biol Chem* **288**, 7294-7304.
- Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, Silani V, Ratti A (2009) TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem* **111**, 1051-1061.
- Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW (1997) The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet* **6**, 1465-1472.
- Courchet J, Buchet-Poyau K, Potemski A, Bres A, Jariel-Encontre I, Billaud M (2008) Interaction with 14-3-3 adaptors regulates the sorting of hMex-3B RNA-binding protein to distinct classes of RNA granules. *J Biol Chem* **283**, 32131-32142.
- Crick F (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561-563.
- Dang Y, Kedersha N, Low WK, Romo D, Gorospe M, Kaufman R, Anderson P, Liu JO (2006) Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem* **281**, 32870-32878.
- De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R (2002) Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **22**, 8332-8341.
- De Leeuw F, Zhang T, Wauquier C, Huez G, Kruys V, Gueydan C (2007) The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp Cell Res* **313**, 4130-4144.
- Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P, 3rd, Good SK, Johnson BA, Herz J, Yu G (2011) TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol Cell Biol* **31**, 1098-1108.
- Didiot MC, Subramanian M, Flatter E, Mandel JL, Moine H (2009) Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly. *Mol Biol Cell* **20**, 428-437.
- Dolzhanskaya N, Merz G, Aletta JM, Denman RB (2006a) Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *J Cell Sci* **119**, 1933-1946.
- Dolzhanskaya N, Merz G, Denman RB (2006b) Oxidative stress reveals heterogeneity of FMRP granules in PC12 cell neurites. *Brain Res* **1112**, 56-64.
- Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C (2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* **29**, 2841-2857.
- Eisinger-Mathason TS, Andrade J, Groehler AL, Clark DE, Muratore-Schroeder TL, Pasic L, Smith JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Macara IG, Lannigan DA (2008) Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell* **31**, 722-736.
- Emara MM, Fujimura K, Sciaranghella D, Ivanova V, Ivanov P, Anderson P (2012) Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2alpha phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 763-769.

- Emara MM, Ivanov P, Hickman T, Dawra N, Tisdale S, Kedersha N, Hu GF, Anderson P (2010) Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J Biol Chem* **285**, 10959-10968.
- Fournier MJ, Coudert L, Mellaoui S, Adjibade P, Gareau C, Cote MF, Sonenberg N, Gaudreault RC, Mazroui R (2013) Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation. *Mol Cell Biol* **33**, 2285-2301.
- Fournier MJ, Gareau C, Mazroui R (2010) The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int* **10**, 12.
- Fraser CS, Berry KE, Hershey JW, Doudna JA (2007) eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit. *Mol Cell* **26**, 811-819.
- Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP (2010) Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res* **9**, 1104-1120.
- Fujimura K, Kano F, Murata M (2008a) Dual localization of the RNA binding protein CUGBP-1 to stress granule and perinucleolar compartment. *Exp Cell Res* **314**, 543-553.
- Fujimura K, Kano F, Murata M (2008b) Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies. *RNA* **14**, 425-431.
- Fujimura K, Katahira J, Kano F, Yoneda Y, Murata M (2009) Microscopic dissection of the process of stress granule assembly. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1728-1737.
- Fujimura K, Sasaki AT, Anderson P (2012) Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules. *Nucleic Acids Res* **40**, 8099-8110.
- Fujimura K, Suzuki T, Yasuda Y, Murata M, Katahira J, Yoneda Y (2010) Identification of importin alpha1 as a novel constituent of RNA stress granules. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 865-871.
- Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M, Malim MH (2007) Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol* **81**, 2165-2178.
- Gallouzi IE, Brennan CM, Stenberg MG, Swanson MS, Eversole A, Maizels N, Steitz JA (2000) HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3073-3078.
- Gao X, Ge L, Shao J, Su C, Zhao H, Saarikettu J, Yao X, Yao Z, Silvennoinen O, Yang J (2010) Tudor-SN interacts with and co-localizes with G3BP in stress granules under stress conditions. *FEBS Lett* **584**, 3525-3532.
- Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* **15**, 5383-5398.
- Goncalves Kde A, Bressan GC, Saito A, Morello LG, Zanchin NI, Kobarg J (2011) Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery. *FEBS Lett* **585**, 2556-2560.
- Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH, Jr. (2007) LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol Cell Biol* **27**, 6469-6483.
- Goulet I, Boisvenue S, Mokas S, Mazroui R, Cote J (2008) TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet* **17**, 3055-3074.
- Guil S, Long JC, Caceres JF (2006) hnRNP A1 relocation to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol* **26**, 5744-5758.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099-1108.
- Henao-Mejia J, He JJ (2009) Sam68 relocation into stress granules in response to oxidative stress through complexing with TIA-1. *Exp Cell Res* **315**, 3381-3395.
- * Hinnebusch AG (2011) Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 434-467, first page of table of contents.

- Hofmann I, Casella M, Schnolzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW (2006) Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Mol Biol Cell* **17**, 1388-1398.
- Hofmann S, Cherkasova V, Bankhead P, Bukau B, Stoecklin G (2012) Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock. *Mol Biol Cell* **23**, 3786-3800.
- Hou H, Wang F, Zhang W, Wang D, Li X, Bartlam M, Yao X, Rao Z (2011) Structure-functional analyses of CRHSP-24 plasticity and dynamics in oxidative stress response. *J Biol Chem* **286**, 9623-9635.
- Hua Y, Zhou J (2004) Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett* **572**, 69-74.
- Chalupnikova K, Lattmann S, Selak N, Iwamoto F, Fujiki Y, Nagamine Y (2008) Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain. *J Biol Chem* **283**, 35186-35198.
- Chang WL, Tarn WY (2009) A role for transportin in deposition of TTP to cytoplasmic RNA granules and mRNA decay. *Nucleic Acids Res* **37**, 6600-6612.
- Ivanov PA, Chudinova EM, Nadezhkina ES (2003) Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation. *Exp Cell Res* **290**, 227-233.
- * Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-127.
- Jedrusik-Bode M, Studencka M, Smolka C, Baumann T, Schmidt H, Kampf J, Paap F, Martin S, Tazi J, Muller KM, Kruger M, Braun T, Bober E (2013) The sirtuin SIRT6 regulates stress granule formation in *C. elegans* and mammals. *J Cell Sci* **126**, 5166-5177.
- Jeon SJ, Seo JE, Yang SI, Choi JW, Wells D, Shin CY, Ko KH (2011) Cellular stress-induced up-regulation of FMRP promotes cell survival by modulating PI3K-Akt phosphorylation cascades. *J Biomed Sci* **18**, 17.
- Kaehler C, Isensee J, Nonhoff U, Terrey M, Hucho T, Lehrach H, Krobitsch S (2012) Ataxin-2-like is a regulator of stress granules and processing bodies. *PLoS One* **7**, e50134.
- Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J, Anderson P (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* **13**, 195-210.
- Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* **151**, 1257-1268.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* **169**, 871-884.
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* **147**, 1431-1442.
- Khandjian EW, Bardoni B, Corbin F, Sittler A, Giroux S, Heitz D, Tremblay S, Pinset C, Montarras D, Rousseau F, Mandel J (1998) Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. *Hum Mol Genet* **7**, 2121-2128.
- Kim JE, Ryu I, Kim WJ, Song OK, Ryu J, Kwon MY, Kim JH, Jang SK (2008) Proline-rich transcript in brain protein induces stress granule formation. *Mol Cell Biol* **28**, 803-813.
- Kim WJ, Back SH, Kim V, Ryu I, Jang SK (2005) Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol Cell Biol* **25**, 2450-2462.
- Kim WJ, Kim JH, Jang SK (2007) Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *EMBO J* **26**, 5020-5032.
- Kobayashi T, Winslow S, Sunesson L, Hellman U, Larsson C (2012) PKCalpha binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress. *PLoS One* **7**, e35820.

- Kolobova E, Efimov A, Kaverina I, Rishi AK, Schrader JW, Ham AJ, Larocca MC, Goldenring JR (2009) Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules. *Exp Cell Res* **315**, 542-555.
- Kozak SL, Marin M, Rose KM, Bystrom C, Kabat D (2006) The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem* **281**, 29105-29119.
- Kunde SA, Musante L, Grimme A, Fischer U, Muller E, Wanker EE, Kalscheuer VM (2011) The X-chromosome-linked intellectual disability protein PQBP1 is a component of neuronal RNA granules and regulates the appearance of stress granules. *Hum Mol Genet* **20**, 4916-4931.
- Kwon S, Zhang Y, Matthias P (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev* **21**, 3381-3394.
- Lai MC, Lee YH, Tarn WY (2008) The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell* **19**, 3847-3858.
- Lane DJ, Saletta F, Suryo Rahmanto Y, Kovacevic Z, Richardson DR (2013) N-myc downstream regulated 1 (NDRG1) is regulated by eukaryotic initiation factor 3a (eIF3a) during cellular stress caused by iron depletion. *PLoS One* **8**, e57273.
- Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA (2006) Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18125-18130.
- Leung AK, Vyas S, Rood JE, Bhutkar A, Sharp PA, Chang P (2011) Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol Cell* **42**, 489-499.
- Levenga J, Buijsen RA, Rife M, Moine H, Nelson DL, Oostra BA, Willemsen R, de Vrij FM (2009) Ultrastructural analysis of the functional domains in FMRP using primary hippocampal mouse neurons. *Neurobiol Dis* **35**, 241-250.
- Li CH, Ohn T, Ivanov P, Tisdale S, Anderson P (2010) eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. *PLoS One* **5**, e9942.
- Lin JC, Hsu M, Tarn WY (2007) Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2235-2240.
- Linder B, Plottner O, Kroiss M, Hartmann E, Laggenbauer B, Meister G, Keidel E, Fischer U (2008) Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. *Hum Mol Genet* **17**, 3236-3246.
- Loschi M, Leishman CC, Berardone N, Boccaccio GL (2009) Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *J Cell Sci* **122**, 3973-3982.
- Low WK, Dang Y, Schneider-Poetsch T, Shi Z, Choi NS, Merrick WC, Romo D, Liu JO (2005) Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A. *Mol Cell* **20**, 709-722.
- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T (2011) Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* **39**, D52-57.
- Mahboubi H, Seganathy E, Kong D, Stochaj U (2013) Identification of Novel Stress Granule Components That Are Involved in Nuclear Transport. *PLoS One* **8**, e68356.
- Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M (2013) Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells* **18**, 135-146.
- * Maurin T, Zongaro S, Bardoni B (2014) Fragile X Syndrome: From molecular pathology to therapy. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Mazan-Mamczarz K, Lal A, Martindale JL, Kawai T, Gorospe M (2006) Translational repression by RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol* **26**, 2716-2727.
- Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE (2007) Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell* **18**, 2603-2618.

- Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* **11**, 3007-3017.
- McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, Rouleau GA, Vande Velde C (2011) TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum Mol Genet* **20**, 1400-1410.
- Mokas S, Mills JR, Garreau C, Fournier MJ, Robert F, Arya P, Kaufman RJ, Pelletier J, Mazroui R (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell* **20**, 2673-2683.
- Morris AR, Mukherjee N, Keene JD (2008) Ribonomic analysis of human Pum1 reveals cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets. *Mol Cell Biol* **28**, 4093-4103.
- Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Tsunoda Y, Suzuki N (2010) Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43. *J Biol Chem* **285**, 608-619.
- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzeret D, Yaspo ML, Lehrach H, Krobitsch S (2007) Ataxin-2 Interacts with the DEAD/H-Box RNA Helicase DDX6 and Interferes with P-Bodies and Stress Granules. *Mol Biol Cell* **18**, 1385-1396.
- Nousch M, Reed V, Bryson-Richardson RJ, Currie PD, Preiss T (2007) The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. *RNA* **13**, 374-384.
- Nover L, Scharf KD, Neumann D (1989) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**, 1298-1308.
- Ogawa F, Kasai M, Akiyama T (2005) A functional link between Disrupted-In-Schizophrenia 1 and the eukaryotic translation initiation factor 3. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 771-776.
- Ohn T, Kedersha N, Hickman T, Tisdale S, Anderson P (2008) A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol* **10**, 1224-1231.
- Onishi H, Kino Y, Morita T, Futai E, Sasagawa N, Ishiura S (2008) MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. *J Neurosci Res* **86**, 1994-2002.
- Pare JM, Tahbaz N, Lopez-Orozco J, LaPointe P, Lasko P, Hobman TC (2009) Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol Biol Cell* **20**, 3273-3284.
- Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Kruys V, Streuli M, Anderson P (2000) TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *EMBO J* **19**, 4154-4163.
- Pizzo E, Sarcinelli C, Sheng J, Fusco S, Formiggini F, Netti P, Yu W, D'Alessio G, Hu GF (2013) Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. *J Cell Sci* **126**, 4308-4319.
- Quaresma AJ, Bressan GC, Gava LM, Lanza DC, Ramos CH, Kobarg J (2009) Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments. *Exp Cell Res* **315**, 968-980.
- Reineke LC, Dougherty JD, Pierre P, Lloyd RE (2012) Large G3BP-induced granules trigger eIF2 α phosphorylation. *Mol Biol Cell* **23**, 3499-3510.
- Rigby WF, Roy K, Collins J, Rigby S, Connolly JE, Bloch DB, Brooks SA (2005) Structure/function analysis of tristetraprolin (TTP): p38 stress-activated protein kinase and lipopolysaccharide stimulation do not alter TTP function. *J Immunol* **174**, 7883-7893.
- Sama RR, Ward CL, Kaushansky LJ, Lemay N, Ishigaki S, Urano F, Bosco DA (2013) FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress. *J Cell Physiol* **228**, 2222-2231.
- Shih JW, Wang WT, Tsai TY, Kuo CY, Li HK, Wu Lee YH (2012) Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response. *Biochem J* **441**, 119-129.

- Schaffler K, Schulz K, Hirmer A, Wiesner J, Grimm M, Sickmann A, Fischer U (2010) A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation. *RNA* **16**, 1488-1499.
- Schultz-Pedersen S, Hasle H, Olsen JH, Friedrich U (2001) Evidence of decreased risk of cancer in individuals with fragile X. *Am J Med Genet* **103**, 226-230.
- Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**, 291-298.
- Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1995) FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J* **14**, 2401-2408.
- Siomi MC, Zhang Y, Siomi H, Dreyfuss G (1996) Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol* **16**, 3825-3832.
- Solomon S, Xu Y, Wang B, David MD, Schubert P, Kennedy D, Schrader JW (2007) Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α , entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol Cell Biol* **27**, 2324-2342.
- Stoecklin G, Stubbs T, Kedersha N, Wax S, Rigby WF, Blackwell TK, Anderson P (2004) MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J* **23**, 1313-1324.
- Stohr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH, Huttelmaier S (2006) ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol* **175**, 527-534.
- Suzuki Y, Minami M, Suzuki M, Abe K, Zenno S, Tsujimoto M, Matsumoto K, Minami Y (2009) The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G. *J Biol Chem* **284**, 35597-35604.
- Tamanini F, Bontekoe C, Bakker CE, van Unen L, Anar B, Willemsen R, Yoshida M, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT (1999a) Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet* **8**, 863-869.
- Tamanini F, Van Unen L, Bakker C, Sacchi N, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT (1999b) Oligomerization properties of fragile-X mental-retardation protein (FMRP) and the fragile-X-related proteins FXR1P and FXR2P. *Biochem J* **343 Pt 3**, 517-523.
- Tanaka T, Ohashi S, Kobayashi S (2014) Roles of YB-1 under arsenite-induced stress: translational activation of HSP70 mRNA and control of the number of stress granules. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 985-992.
- Taniuchi K, Nishimori I, Hollingsworth MA (2011) Intracellular CD24 inhibits cell invasion by posttranscriptional regulation of BART through interaction with G3BP. *Cancer Res* **71**, 895-905.
- The UniProt Consortium (2014) Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **42**, D191-198.
- Thedieck K, Holzwarth B, Prentzell MT, Boehlke C, Klasener K, Ruf S, Sonntag AG, Maerz L, Grellscheid SN, Kremmer E, Nitschke R, Kuehn EW, Jonker JW, Groen AK, Reth M, Hall MN, Baumeister R (2013) Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells. *Cell* **154**, 859-874.
- Thiagarajan D, Dev RR, Khosla S (2011) The DNA methyltransferase Dnmt2 participates in RNA processing during cellular stress. *Epigenetics* **6**, 103-113.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL (2009) Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci* **122**, 563-573.
- Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* **160**, 823-831.
- Vessey JP, Vaccani A, Xie Y, Dahm R, Karra D, Kiebler MA, Macchi P (2006) Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules. *J Neurosci* **26**, 6496-6508.

- Villa N, Do A, Hershey JW, Fraser CS (2013) Human eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) protein binds to eIF3c, -d, and -e to promote mRNA recruitment to the ribosome. *J Biol Chem* **288**, 32932-32940.
- Villace P, Marion RM, Ortin J (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**, 2411-2420.
- Wachter K, Kohn M, Stohr N, Huttelmaier S (2013) Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biol Chem* **394**, 1077-1090.
- Wang Y, Lacroix G, Haines J, Doukhanine E, Almazan G, Richard S (2010) The QKI-6 RNA binding protein localizes with the MBP mRNAs in stress granules of glial cells. *PLoS One* **5**.
- Wasserman T, Katsenelson K, Daniliuc S, Hasin T, Choder M, Aronheim A (2010) A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation. *Mol Biol Cell* **21**, 117-130.
- Wehner KA, Schutz S, Sarnow P (2010) OGFOD1, a novel modulator of eukaryotic translation initiation factor 2alpha phosphorylation and the cellular response to stress. *Mol Cell Biol* **30**, 2006-2016.
- Weinmann L, Hock J, Ivacevic T, Ohrt T, Mutze J, Schwille P, Kremmer E, Benes V, Urlaub H, Meister G (2009) Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* **136**, 496-507.
- Weissbach R, Scadden AD (2012) Tudor-SN and ADAR1 are components of cytoplasmic stress granules. *RNA* **18**, 462-471.
- Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2005) The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci* **118**, 981-992.
- Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska MG, Wanka S, Aebersold R, Pelkmans L (2013) Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. *Cell* **152**, 791-805.
- Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P (2009) Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol* **185**, 35-42.
- Yang WH, Bloch DB (2007) Probing the mRNA processing body using protein macroarrays and "autoantigenomics". *RNA* **13**, 704-712.
- Yang WH, Yu JH, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB (2006) RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* **12**, 547-554.
- Yu C, York B, Wang S, Feng Q, Xu J, O'Malley BW (2007) An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell* **25**, 765-778.
- Zhang J, Okabe K, Tani T, Funatsu T (2011) Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. *J Cell Sci* **124**, 4087-4095.
- Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1995) The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J* **14**, 5358-5366.
- Zhu CH, Kim J, Shay JW, Wright WE (2008) SGNP: an essential Stress Granule/Nucleolar Protein potentially involved in 5.8s rRNA processing/transport. *PLoS One* **3**, e3716.
- Zou T, Yang X, Pan D, Huang J, Sahin M, Zhou J (2011) SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress. *Cell Mol Neurobiol* **31**, 541-550.