

# Mehanizmi kontrole pravilnog smatanja proteina

---

Vuković, Dona

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:019702>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Dona Vuković

**Mehanizmi kontrole pravilnog smatanja  
proteina**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Dona Vuković

**Control mechanisms governing protein  
folding**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Mehanizmi kontrole pravilnog smatanja proteina

Dona Vuković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biološka funkcija proteina uvelike ovisi o njihovoj konformaciji, stoga je proces smatanja kojim proteini poprimaju pravilnu trodimenzionalnu strukturu iznimno važan i kontroliran u stani. Smatanje je potpomognuto molekularnim šaperonima koji stupaju u interakciju s novosintetiziranim proteinima. Endoplazmatski retikulum (ER) važan je organel u kojem se smata i doraduje gotovo trećina staničnih proteina. Ukoliko je njegova homeostaza narušena dolazi do nakupljanja nesmotanih proteina i stanja poznatog kao stres endoplazmatskog retikuluma. Posljedično dolazi do aktivacije odgovora na nesmotane proteine (UPR), staničnog obrambenog mehanizma koji nastoji smanjiti količinu nesmotanih proteina u ER-u. Provođenje signala inducirano je senzornim proteinima smještenima u membrani ER-a. Kod kvasca je to protein Ire1, a kod Metazoa IRE1, PERK i ATF6. Rezultat signalne kaskade je povećana transkripcija gena čiji su produkti uključeni u smatanje proteina i sintezu membrane ER-a, ali i smanjenje sinteze staničnih proteina. UPR regulira i proces degradacije povezane s endoplazmatskim retikulumom (ERAD) za proteine koji ne mogu biti pravilno smotani. Ispravno funkcioniranje navedenih mehanizama važno je za organizam budući da nakupljanje nesmotanih proteina i formiranje proteinskih agregata može uzrokovati mnoge bolesti.

Ključne riječi: stres endoplazmatskog retikuluma, odgovor na nesmotane proteine, IRE1, PERK, ATF6, degradacija proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom  
(23 stranice, 6 slika, 0 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: izv. prof. dr.sc. Maja Matulić

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

## Control mechanisms governing protein folding

Dona Vuković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Biological function of proteins largely depends on their conformation, therefore the folding process by which proteins arrange in a proper three-dimensional structure is extremely important and controlled in the cell. Folding is assisted by molecular chaperones that interact with newly synthesized proteins. The endoplasmic reticulum (ER) is an important organelle in which almost a third of cellular proteins are folded and modified. If ER homeostasis is disturbed, unfolded proteins accumulate in its lumen leading to a condition known as endoplasmic reticulum stress. As a result, a cellular defense mechanism known as the unfolded protein response (UPR) is activated. UPR strives to reduce the content of unfolded proteins in the ER. Signal transduction is induced by sensory proteins located in the ER membrane. Ire1 is present in yeast, and proteins IRE1, PERK and ATF6 are present in Metazoans. The result of the signaling cascade is increased transcription of genes whose products are involved in protein folding and ER membrane synthesis, and also reduction of global protein synthesis. If protein cannot be properly folded, it is degraded by the process called endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) which is also regulated by the UPR. Proper functioning of these mechanisms is important for the organism since the accumulation of unfolded proteins and formation of protein aggregates can cause various diseases.

Keywords: endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, IRE1, PERK, ATF6, endoplasmic reticulum-associated protein degradation  
(23 pages, 6 figures, 0 tables, 56 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Smatanje proteina u eukariota pomoću molekularnih šaperona.....	2
2.1. Citosolni šaperoni.....	3
2.2. Šaperoni endoplazmatskog retikuluma.....	5
3. Mehanizmi kontrole smatanja proteina u endoplazmatskom retikulumu.....	6
3.1. Odgovor na nesmotane proteine.....	6
3.1.1. Odgovor na nesmotane proteine kod kvasca ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	7
3.1.2. Odgovor na nesmotane proteine kod Metazoa.....	8
3.2. Degradacija proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom.....	13
3.2.1. Degradacija proteina povezana s ER-om kod kvasca.....	14
3.2.2. Degradacija proteina povezana s ER-om kod Metazoa.....	15
4. Zaključak.....	16
5. Literatura.....	17
6. Životopis.....	23

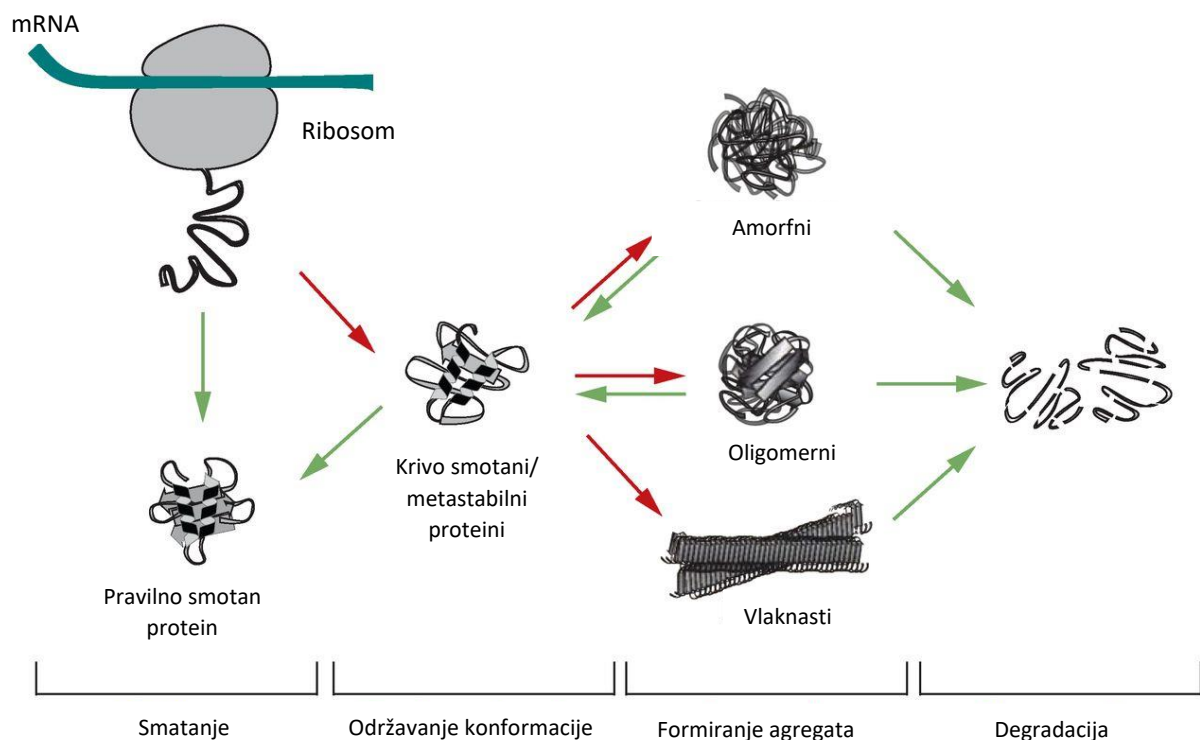
# 1. Uvod

Proteini su biološke makromolekule izgrađene od jednog ili više lanaca aminokiselina povezanih peptidnim vezama. U stanici proteini obavljaju niz esencijalnih funkcija kao što su kataliza biokemijskih reakcija, održavanje oblika stanice, organizacija staničnih dijelova, prijenos signala unutar stanice, pružanje mehaničke potpore i imunosne zaštite. Brojni proteini služe kao membranski kanali i pumpe za prijenos molekula izvan ili unutar stanice, a brojni su i receptori koji specifično prepoznaju određene molekule (Alberts i sur., 2015; Berg i sur., 2007). Proteini se sintetiziraju na ribosomima procesom translacije kao linearni lanci aminokiselina, a kako bi uopće mogli vršiti svoju funkciju iznimno je važno da poprime nativnu konformaciju, odnosno da se pravilno smotaju u svoju stabilnu trodimenzionalnu strukturu koja ovisi o primarnoj strukturi proteina, odnosno slijedu aminokiselina. Zbog velike važnosti kvalitete staničnog proteoma, stanice su evoluirale brojne mehanizme kojima to osiguravaju (Anfinsen, 1973; Vabulas i sur., 2010). Dok se neki proteini mogu spontano smatati, većina ih ipak zahtijeva pomoć drugih proteina. Ti pomoćni proteini nazivaju se molekularni šaperoni (Hartl, 1996). Topivi proteini smataju se na način da su hidrofobni bočni ogranci aminokiselina smješteni u unutrašnjosti, a hidrofilni na površini. Za razliku od njih, transmembranski dijelovi proteina integriranih u membranu imaju drugačiji raspored jer hidrofobni bočni ogranci ostvaruju interakcije s masnim kiselinama lipidnog dvosloja (Nelson & Cox, 2012). Sam proces smatanja proteina kod eukariota odvija se kotranslacijski ili posttranslacijski u citosolu i endoplazmatskom retikulumu. Endoplazmatski retikulum organel je u kojem su prisutni sustavi potrebni za smatanje, kontrolu kvalitete, odgovor na nakupljanje nesmotanih proteina te sustavi koji posreduju pri degradaciji nepravilno smotanih proteina. Svi oni osiguravaju da proteini prilikom napuštanja endoplazmatskog retikuluma budu u pravilnoj konformaciji (Kleizen i Braakman, 2004). Proteini koji nisu smotani te oni koji su djelomično i nepravilno smotani imaju izložene hidrofobne bočne ogranke aminokiselina te su skloni stvaranju agregata čije nakupljanje može biti štetno za stanicu, stoga ih stanica nastoji ukloniti putevima degradacije. Održavanje stabilnog proteoma iznimno je važno za ispravno funkcioniranje same stanice, a omogućuje ga stanična proteostaza koja podrazumijeva međusobnu usklađenost procesa uključenih u sintezu, smatanje i degradaciju proteina (Balchin i sur., 2016; Nelson i Cox, 2012).



## 2. Smatanje proteina u eukariota pomoću molekularnih šaperona

Smatanje mnogih proteina zahtijeva djelovanje molekularnih šaperona. Šaperoni stupaju u interakciju s nesmotanim proteinima ili novosintetiziranim proteinima koji nastaju na ribosomu i stabiliziraju ih te pomažu pravilno smatanje ili osiguravaju mikrookoliš u kojem se ono odvija. Vezanjem za nesmotane ili djelomično smotane proteine sprječavaju nepravilne interakcije i stvaranje agregata. Također mogu razmatati krivo smotane proteine te ih izvlačiti iz agregata, ali i usmjeravati u degradaciju. Pomažu i sastavljanje oligomernih proteina (Balchin i sur., 2016; Hartl, 1996; Nelson i Cox, 2012). Uzevši u obzir sve navedene uloge, jasno je da su šaperoni važni čimbenici stanične proteostaze i održavanja stabilnog proteoma (Slika 1.).



Slika 1. Shematski prikaz uloga molekularnih šaperona u održavanju stabilnog proteoma stanice. Zelenim strelicama prikazani su putevi potaknuti šaperonima, a crvenim strelicama putevi koje nastoje spriječiti. Šaperoni potiču smatanje novosintetiziranih proteina, sprječavaju nastajanje agregata, usmjeravaju proteine u pravilno smatanje ili degradaciju. Preuzeto i prilagođeno prema Balchin i sur., 2016.

Postoji nekoliko porodica molekularnih šaperona koje sudjeluju u smatanju proteina. Mnogi šaperoni, unatoč tome što su konstitutivno eksprimirani, pojačano se sintetiziraju u

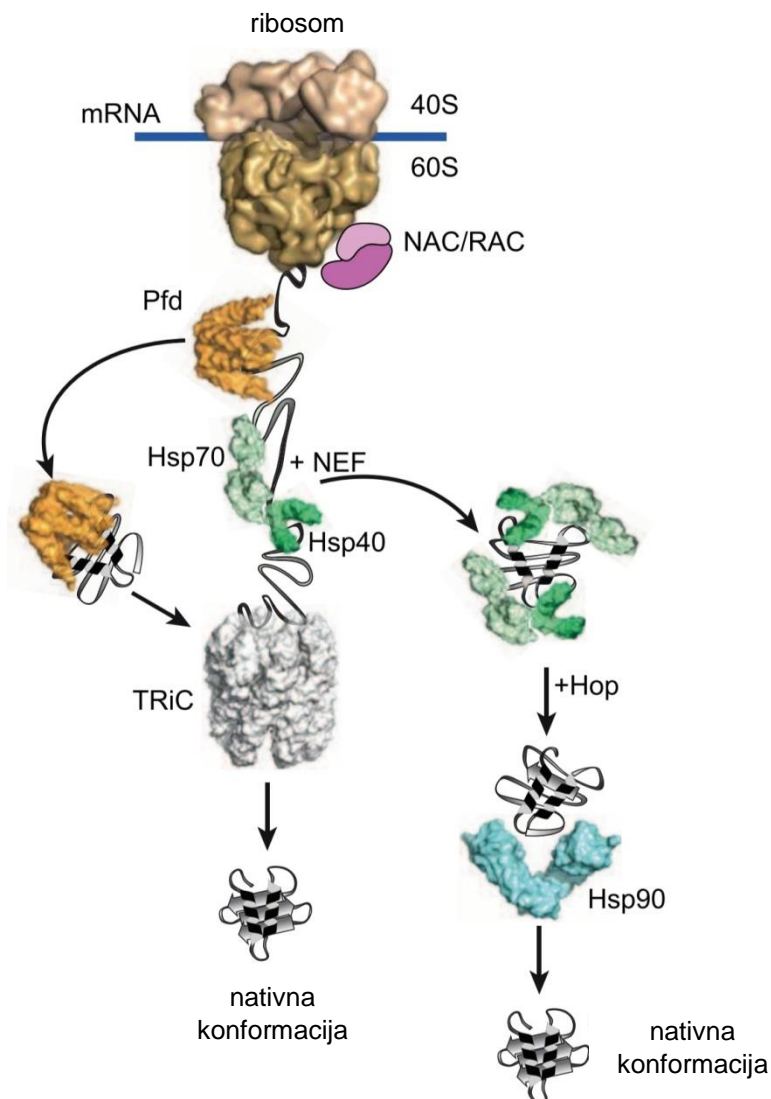
stresnim uvjetima, stoga se nazivaju i proteinima stresa ili proteinima *heat shock* (Hsp). Porodice šaperona formirane su prema njihovoj molekulskoj masi i dijele se na male Hsp, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp100 (Vabulas i sur., 2010).

## 2.1. Citosolni šaperoni

U citosolu eukariota djeluje nekoliko skupina šaperona (Slika 2.). Rastući polipeptidni lanci po izlasku s ribosoma prvo stupaju u interakciju sa šaperonima koji su povezani s ribosomom. Kod eukariota su to kompleks NAC (engl. *nascent-chain-associated complex*) i RAC (engl. *ribosome-associated complex*). Heterodimerni kompleks NAC sastoji se od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice. Za veliku podjedinicu ribosoma vezan je preko  $\beta$  podjedinice te stupa u interakciju s kratkim rastućim polipeptidnim lancima. Kompleks RAC kod kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) sastoji se od proteina Ssz1 iz porodice Hsp70 te košaperona koji se veže za ribosom, zootina iz porodice Hsp40. Homolozi ovih dvaju proteina kod sisavaca su proteini Hsp70L1 i Mpp11. Kompleks RAC kod kvasca surađuje s proteinima Ssb1 i Ssb2 koji mogu biti vezani za ribosom ili slobodni u citosolu te stabiliziraju rastući polipeptidni lanac. Uz pomoć ova dva kompleksa potpuno se može smotati oko 70% staničnih proteina bez potrebe za drugim šaperonima (Balchin i sur., 2016; Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

Proteini koji se ne smotaju sa šaperonima povezanima s ribosomom stupaju u interakciju sa šaperonima porodice Hsp70. Osim poticanja kotranslacijskog i posttranslacijskog smatanja, ovi šaperoni sprječavaju agregaciju, sudjeluju u disagregaciji, ponovnom smatanju, unutarstaničnom transportu proteina te usmjeravanju u degradaciju. Kod kvasca su to proteini Ssa1-4, a kod viših eukariota protein Hsc70 koji je konstitutivno eksprimiran, i protein Hsp70, induciran stresom. Sastoje od dviju domena, N-terminalne domene koja veže nukleotid i C-terminalne domene koja veže supstrat. Oni funkcioniraju zajedno s košaperonima porodice Hsp40 u ciklusu vezanja i otpuštanja supstrata ovisnom o ATP-u, uz pomoć faktora izmjene nukleotida (engl. *nucleotide exchange factor*, NEF) te na taj način pomažu postizanje nativne konformacije oko 20% staničnih proteina. Smatanje nekih proteina uključenih u prijenos signala zahtijeva i djelovanje šaperona porodice Hsp90. To su homodimerni proteini koji preko proteina Hop (engl. *Hsp organizing protein*) primaju nepotpuno smotani protein od šaperona porodice Hsp70 i dovode ga do njegove nativne konformacije (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Vabulas i sur., 2010).

Za potpuno smatanje oko 10% proteina, uključujući i proteine citoskeleta, potrebni su šaperonini, proteini koji svojom prstenastom građom osiguravaju odjeljke u kojima se odvija smatanje proteina. Eukariotski šaperonin TriC sastoji se od dva prstena od po osam podjedinica. Djeluje nizvodno od šaperona porodice Hsp70 ili prima nastajući lanac od proteina prefoldina (Pfd). Šaperonini funkcioniraju tako da zarobe supstrat u središnjoj šupljini gdje mu se onda mijenja konformacija uz utrošak ATP-a, a zaštićen je od agregacije s drugim nesmotanim proteinima (Balchin i sur., 2016; Hartl & Hayer-Hartl, 2002).



Slika 2. Putevi smatanja proteina pomoću citosolnih šaperona u eukariota. Pomoću kompleksa NAC i RAC uspješno se smota oko 70% proteina. Nizvodno od ribosoma, oko 20% proteina se smota pomoću šaperona Hsp70 i Hsp40 uz faktor izmjene nukleotida (NEF), a dio njih se preko proteina Hop prenosi do šaperona Hsp90 kako bi poprimili nativnu konformaciju. Oko 10% proteina poprima nativnu konformaciju pomoću šaperonina TRiC koji djeluje nizvodno od šaperona Hsp70 ili prima nastajući protein preko proteina prefoldina (Pfd). Preuzeto i prilagođeno prema Balchin i sur., 2016.

## 2.2. Šaperoni endoplazmatskog retikuluma

Endoplazmatski retikulum (ER) primarni je organel u kojem se osigurava točnost proizvodnje sekretornih i membranskih proteina. Ti su proteini kotranslacijski ili su posttranslacijski translocirani u lumen ER-a, nakon čega započinje proces smatanja, a kad su spremni za izlaz iz ER-a, pakiraju se u transportne vezikule i prenose do odredišta. U ER-u su prisutni šaperoni porodica Hsp40, Hsp70, Hsp90 te lektinski šaperoni (Hebert & Molinari, 2007). U viših eukariota protein BiP (engl. *binding immunoglobuline protein*) ili Grp78, član porodice Hsp70, glavni je šaperon i regulator funkcije ER-a, a kvašćev homolog je protein Kar2. U djelovanju surađuje s košaperonima ERdj1-7 iz porodice Hsp40 te faktorima izmjene nukleotida BAP (Sil1) i Grp170. Osim što sudjeluje u samom smatanju, protein BiP potpomaže translokaciju proteina u ER, neispravno smotane proteine usmjerava u retrogradnu translokaciju u citosol kako bi bili degradirani, te sudjeluje u regulaciji odgovora na nesmotane proteine (engl. *the unfolded protein response*, UPR) (Braakman & Hebert, 2013; Hendershot, 2004). Protein Grp94 koji spada u porodicu Hsp90 preuzima određene supstrate (npr. imonoglobuline) nakon što su se povezali s proteinom BiP i omogućuje im poprimanje pravilne konformacije (Melnick i sur., 1994).

Brojni proteini u endoplazmatskom retikulumu podliježu N-glikozilaciji, kovalentnoj modifikaciji kojom je na bočni ogranak asparagina u aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser/Thr kotranslacijski dodan prethodno formirani glikan sastavljen od tri glukoze, devet manoza i dva N-acetilglukozamina. Jedan glukozni ostatak odmah je uklonjen glukozidazom I, a drugi glukozidazom II. Takav monoglukozilirani glikoprotein prepoznanju lektinski šaperoni kalneksin i kalretikulin. Oni potiču pravilno smatanje sprječavajući agregaciju i prerani izlazak proteina iz endoplazmatskog retikuluma. Nakon uklanjanja trećeg glukoznog ostatka glukozidazom II supstrat se oslobađa šaperona. Ispravno smotani glikoproteini napuštaju ER, dok na nepotpuno smotane glikoproteine UDP-glukoza:glikoprotein glukoziltransferaza dodaje jedan glukozni ostatak i na taj način im omogućuje reasocijaciju s kalneksinom ili kalretikulinom i novi pokušaj ispravnog smatanja (Araki & Nagata, 2011).

Osim šaperona, u endoplazmatskom retikulumu prisutni su i drugi enzimi čija je aktivnost važna za postizanje nativne konformacije proteina. Protein disulfid izomeraza (PDI) najprisutnija je oksidoreduktaza koja katalizira formiranje, izomerizaciju i redukciju disulfidne veze između bočnih ogranaaka cisteina. Peptidil-prolil *cis-trans* izomeraze kataliziraju *cis-trans* izomerizaciju peptidne veze N-terminalno od prolina, reakciju koja je

ograničavajući korak tijekom smatanja proteina budući da ima visoku energiju aktivacije (Ellgaard i sur., 2016).

### **3. Mehanizmi kontrole smatanja proteina u endoplazmatskom retikulumu**

#### **3.1. Odgovor na nesmotane proteine**

Održavanje homeostaze endoplazmatskog retikuluma važno je za pravilno funkcioniranje procesa koji se odvijaju u tom organelu uključujući smatanje, modificiranje i provjeru kvalitete proteina. Ukoliko dođe do njezinog narušavanja čimbenicima kao što su smanjenje koncentracije kalcijevih iona, hipoksija, oksidativni stres, nedostatak energije, upala, povećana sinteza proteina i prisutnost pogrešno smotanih proteina, efikasnost proizvodnje proteina u tom organelu znatno je smanjena (Cao & Kaufman, 2012). Neravnoteža između akumulacije nesmotanih i neispravno smotanih proteina u lumenu ER-a i kapaciteta stanične mašinerije da savlada to opterećenje dovodi do stanja poznatog kao stres endoplazmatskog retikuluma (engl. *ER stress*). Posljedično dolazi do aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva kolektivnog naziva odgovor na nesmotane proteine (engl. *the unfolded protein response*, UPR). Svojim djelovanjem, UPR nastoji uspostaviti homeostazu ER-a na nekoliko načina. Povećava kapacitet smatanja proteina u ER-u potičući ekspanziju membrane ER-a i sintezu proteina potrebnih za smatanje. Može potaknuti degradaciju nepravilno smotanih proteina autofagijom ili procesom koji se naziva degradacija proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom (engl. *ER-associated protein degradation*, ERAD). Također, potiče smanjenu stopu sinteze proteina i unosa proteina u ER, a ako homeostaza ne može biti ponovno uspostavljena, potiče indukciju apoptoze potencijalno štetne stanice radi zaštite organizma (Ron & Walter, 2007).

Kod Metazoa su prisutne tri grane UPR-a, odnosno tri signalna puta koja su inicirana transmembranskim senzornim proteinima ER-a: ATF6 (engl. *activating transcription factor 6*), PERK (engl. *protein kinase RNA-like ER kinase*) i IRE1 (engl. *inositol requiring enzyme 1*) koji je prisutan i kod kvasca. Svi putevi funkcioniraju na način da senzorni protein „osjeća“ stanje u lumenu ER-a i prenosi informaciju preko membrane ER-a u citosol i dalje u jezgru stanice. Predloženo je nekoliko modela koji objašnjavaju na koji način senzorni proteini detektiraju stres ER-a. Model direktnog prepoznavanja pretpostavlja da izravno vezanje

nesmotanih proteina za luminalnu domenu proteina IRE1 uzrokuje njegovu oligomerizaciju što rezultira njegovom aktivacijom. U modelu indirektnog prepoznavanja šaperon BiP vezan je za luminalnu domenu proteina IRE1 koji je tada inaktivan. Uslijed stresa ER-a, BiP disocira s IRE1 jer se preferentno veže na nesmotane proteine, a IRE1 onda oligomerizira. U hibridnom modelu su i disocijacija šaperona BiP i vezanje nesmotanog proteina za luminalnu domenu IRE1 potrebni za aktivaciju tog senzornog proteina (Ron & Walter, 2007). Istraživanja su pokazala da je za aktivaciju proteina IRE1 i PERK najvjerojatniji indirektni model, dok je za kvašćev protein Ire1 najvjerojatniji direktan model (Credle i sur., 2005; Gardner & Walter, 2011; Zhou i sur., 2006). Za aktivaciju proteina ATF6 vjerojatno je potrebna disocijacija šaperona BiP s njegove luminalne domene nakon čega se prenosi do Golgijevog aparata gdje je podvrgnut proteolitičkom cijepanju (Ron & Walter, 2007).

### **3.1.1. Odgovor na nesmotane proteine kod kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*)**

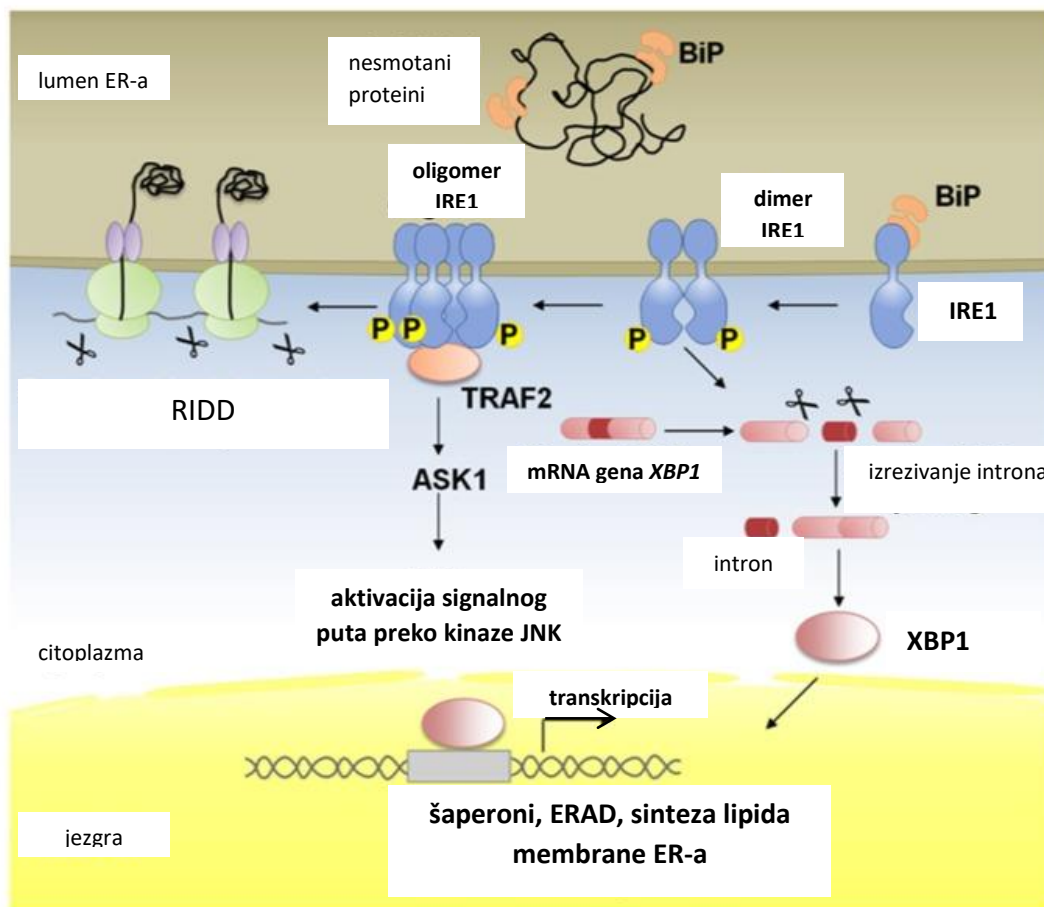
Evolucijski konzerviran senzorni protein Ire1 prisutan je kod svih eukariota, a kod kvasca je jedini koji inducira odgovor na nesmotane proteine. Sastoji se od luminalne domene i dviju citosolnih domena od kojih jedna ima protein kinaznu, a druga ribonukleaznu aktivnost. Detekcija stresa ER-a uzrokuje dimerizaciju i daljnju oligomerizaciju dimernih molekula Ire1 koja rezultira aktivacijom citosolnih domena. Prvo dolazi do trans-autofosforilacije u aktivacijskoj petlji kinaznih domena što povećava afinitet aktivnog mjesta kinaze za vezanje ADP-a. Fosforilirani serinski i treoninski ostaci formiraju intramolekulske i intermolekulske solne mostove koji, uz vezanje ADP-a, pomažu oligomerizaciju molekula Ire1. Time je potaknuta aktivnost ribonukleaze jer interakcije između susjednih molekula Ire1 u uređenom oligomeru stabiliziraju njeno aktivno mjesto (Korennykh i sur., 2009; Lee i sur., 2008; Walter & Ron, 2011). Supstrat za ribonukleazu je mRNA gena *HAC1* koji kodira transkripcijski faktor potreban za povećanu transkripciju ciljnih gena UPR-a. Ribonukleaza izrezuje intron duljine 252 nukleotida koji inače blokira translaciju proteina Hac1, stoga je on prisutan samo u stanicama u kojima je induciran UPR (Cox & Walter 1996; Rügsegger i sur., 2001; Sidrauski & Walter, 1997). 5' i 3' slobodne krajeve egzona povezuje tRNA ligaza Rlg1 (Sidrauski i sur., 1996). Hac1 spada u skupinu regulatornih proteina koji sadrže strukturni motiv leucinskog zatvarača. Nakon translacije ulazi u jezgru i u obliku dimera se veže za DNA. Mjesto vezanja je slijed UPRE (engl. *the unfolded protein response element*) u promotorskim regijama ciljnih gena UPR-a koji uključuju šaperone ER-a i ostale enzime potrebne za smatanje proteina (Cox & Walter, 1996). Hac1 potiče i transkripciju nekih gena

kod kojih slijed UPR-e nije identificiran. Ti geni kodiraju za komponente puta ERAD i enzime potrebne za biosintezu fosfolipida s ciljem ekspanzije membrane ER-a (Back i sur., 2005; Cox i sur., 1997; Travers i sur., 2000). Dakle, djelovanje UPR-a preko senzornog proteina Ire1 smanjuje stres ER-a povećanjem kapaciteta smatanja proteina u ER-u, a ključni korak za prijenos signala je nekonvencionalno procesiranje mRNA gena *HAC1* (Walter & Ron, 2011). Inaktivacija Ire1 je također važna jer njegova konstantna aktivnost smanjuje stanično preživljenje. Unatoč tome što je inicijalno potrebna za aktivaciju ribonukleaze, smatra se da je i za gašenje signala odgovorna kinazna aktivnost pridonoseći destabilizaciji oligomerne strukture, ali nije jasno kojim mehanizmom (Rubio i sur., 2011).

### 3.1.2. Odgovor na nesmotane proteine kod Metazoa

U genomu Metazoa prisutna su dva gena *IRE1*. Protein IRE1 $\alpha$  eksprimiran je u svim tkivima, dok je IRE1 $\beta$  prisutan samo u stanicama intestinalnog epitela. Aktivacija ribonukleazne domene je kao i kod kvašćevog proteina Ire1 potaknuta oligomerizacijom, autofosforilacijom i vezanjem ADP-a. Signal se također prenosi preko nestandardnog procesiranja mRNA tako što ribonukleaza izrezuje intron duljine 26 nukleotida iz mRNA koja kodira transkripcijski faktor XBP1 (engl. X-box-binding protein 1) sa strukturnim motivom leucinskog zatvarača. Ligaza koja spaja 5' i 3' krajeve egzona nije identificirana. Takav XBP1, kao i Hac1, ulazi u jezgru gdje se veže na DNA i potiče transkripciju ciljnih gena UPR-a čiji su produkti uključeni u smatanje, sekreciju i degradaciju proteina te sintezu fosfolipida membrane ER-a. U stanicama se translatira i mRNA gena *XBPI* koja nije podvrgnuta izrezivanju introna duljine 26 nukleotida. Takav proteinski produkt je nestabilan i djeluje kao represor transkripcije ciljnih gena UPR-a (Hetz i sur., 2020; Ron & Walter, 2007). IRE1 procesom reguliranog raspada ovisnom o IRE1 (engl. *regulated IRE1-dependent decay*, RIDD) potiče degradaciju mRNA koje kodiraju proteine usmjerene u ER i na taj način smanjuje opterećenost ER-a proteinima, a samim time i stres ER-a (Hollien i sur., 2009). Usljed produljenog stresa ER-a istim procesom degradira miRNA koja sprječava translaciju inicijatorske kaspaze 2 i na taj način inducira programiranu staničnu smrt (Upton i sur., 2012). Na fosforiliranu citosolnu domenu IRE1 veže se protein TRAF2 (engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) koji uzrokuje aktivaciju kinaza ASK1 (engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*) i IKK (engl. *I $\kappa$ B kinase*). Kinaza ASK1 fosforilacijskom kaskadom uzrokuje aktivaciju kinaze JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) koja svojim nizvodnim djelovanjem može potaknuti apoptotske puteve ili pojačati ekspresiju gena uključenih u upalni

odgovor. Kinaza IKK uzrokuje degradaciju proteina I $\kappa$ B (engl. *inhibitor of  $\kappa$ B*) što oslobađa i aktivira transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*) koji također potiče upalni odgovor (Chakrabarti, 2011). Dakle, kod Metazoa protein IRE1 ima širi spektar djelovanja. Osim što povećava kapacitet smatanja proteina u ER-u, može smanjiti unos proteina u ER, potaknuti apoptozu kada stanica više ne može uspostaviti normalne uvjete, a ako je stres ER-a posljedica infekcije, dovodi do pojačane sinteze komponenata koji sudjeluju u upalnom odgovoru (Slika 3.).



Slika 3. Signalni put odgovora na nesmotane proteine preko senzornog proteina IRE1. Uslijed stresa ER-a, šaperon BiP disocira s IRE1 i veže nesmotane proteine. Dimerizacija, oligomerizacija i autofosforilacija molekula IRE1 dovode do aktivacije ribonukleaze koja izrezuje intron iz mRNA gena *XBP1*. Transkripcijski faktor XBP1 veže se na DNA i uzrokuje pojačanu sintezu šaperona, komponenti uključenih u put ERAD i enzima potrebnih za sintezu lipida membrane ER-a. Procesom RIDD ribonukleaza degradira mRNA koje kodiraju proteine usmjerene u ER. Protein TRAF2 koji se veže za IRE1 aktivira kinazu ASK1 koja uzrokuje aktivaciju kinaze JNK koja potiče apoptozu ili upalni odgovor. Preuzeto i prilagođeno prema Coelho & Domingos, 2014.

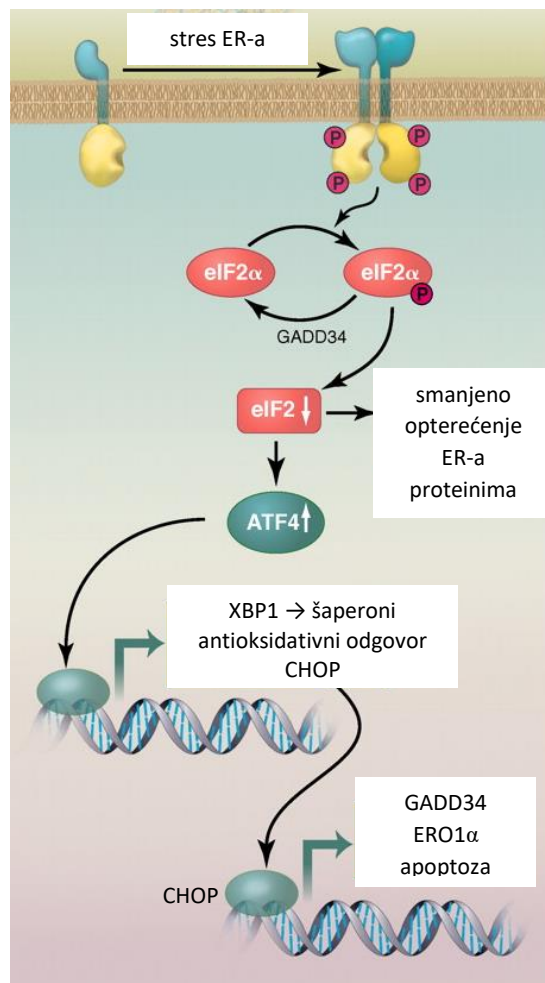
Primijećeno je i da povećana količina masnog tkiva uzrokuje stres ER-a u stanicama jetre i adipocitima. To može biti povezano s inzulinskom rezistencijom i razvojem dijabetesa



tipa II budući da IRE1 može uzrokovati aktivaciju kinaze JNK koja fosforilira i inhibira IRS1 (engl. *insulin receptor substrate 1*) čime je prekinut signal izazvan inzulinom (Ozcan i sur., 2004).

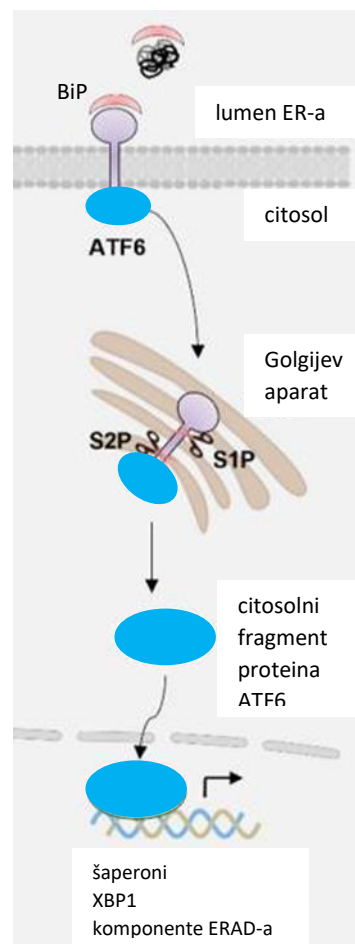
Drugi senzorni protein koji sudjeluje u provođenju UPR-a je PERK. Sastoji se od luminalne i citosolne domene koja ima kinaznu aktivnost. Stres ER-a uzrokuje oligomerizaciju molekula PERK, a posljedično trans-autofosforilaciju u citosolnoj domeni nakon čega aktivirana kinaza fosforilira serin na poziciji 51 u  $\alpha$ -podjedinici heterotrimernog eukariotskog inicijacijskog faktora translacije 2 (engl. *eukaryotic translation initiation factor 2*, eIF2). Protein eIF2 u aktivnom stanju ima vezan GTP koji po završetku aktivnosti hidrolizira. Fosforilacija blokira izmjenu GDP-a s GTP-om koju vrši faktor izmjene nukleotida eIF2B. To dovodi do smanjene stope inicijacije translacije, a samim time i do smanjene količine novosintetiziranih proteina u stanici od kojih su brojni usmjereni u ER. Međutim, uvjeti nedostatka aktivnog eIF2 potiču translaciju transkripcijskog faktora ATF4 (engl. *activating transcription factor 4*). mRNA gena *ATF4* u 5'-netranslatiranoj regiji sadrži dva uzvodna otvorena okvira čitanja (engl. *upstream open reading frame*, uORF) koji se u nestresnim uvjetima preferentno transliraju. Jedan se preklapa s okvirom čitanja koji kodira za ATF4. Povećana količina fosforiliranog eIF2 uzrokuje odgodu reinicijacije translacije nakon translacije uORF1, što omogućuje ribosomu da zaobiđe uORF2 i translira ORF gena *ATF4*. Protein ATF4 ulazi u jezgru i povećava transkripciju gena uključenih u metabolizam aminokiselina, antioksidativni odgovor, ali i transkripciju ranije spomenutog gena *XBPI* pridonoseći amplifikaciji signala (Ron & Walter, 2007; Vattem & Wek, 2004). ATF4 potiče sintezu transkripcijskog faktora CHOP (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*) koji formira heterodimer s ATF4 te uslijed dugotrajnog stresa ER-a inducira apoptozu na nekoliko načina. Kao prvo, regulira sintezu proteina uključenih u apoptotske puteve (npr. proteina porodice Bcl-2). Nadalje, općenito pridonosi povećanju sinteze staničnih proteina time što povećava ekspresiju gena koji kodiraju za proteine uključene u proces translacije, ali i time što potiče sintezu proteina GADD34 (eng. *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*). GADD34 uključen je u negativnu povratnu spregu koja omogućuje oporavak od stresa i ponovnu uspostavu translacije. Asocirajući s protein fosfatazom I (engl. *protein phosphatase I*, PPI) defosforilira eIF2 što omogućuje odvijanje translacije i oporavak stanice ako je stres ER-a savladan. Međutim, povećanje količine proteina u stanici koja je već pod stresom dodatno opterećuje ER, stoga može doći do apoptoze. Zbog veće količine novosintetiziranih proteina veća je potreba za

oksidoreduktazom ERO1 $\alpha$  (engl. *ER oxidase 1 $\alpha$* ) koja sudjeluje u stvaranju disulfidnih mostova i pritom proizvodi vodikov peroksid. Tako se povećava oksidativni stres, a posljedično može doći do apoptoze (Han i sur., 2013; Rozpedek i sur., 2016). Prilikom visoke stope fosforilacije eIF2 aktivira se i NF- $\kappa$ B razgradnjom inhibitora I $\kappa$ B (Ron i Walter, 2007). Zaključno, primarno signaliziranje putem proteina PERK odvija se preko kontrole translacije i uzrokuje smanjenje ukupne sinteze proteina. Time je reducirano opterećenje ER-a proteinima i potaknuto je stanično preživljenje, a tijekom kroničnog stresa ER-a potaknuta je stanična smrt (Slika 4.).



Slika 4. Signalni put odgovora na nesmotane proteine preko senzornog proteina PERK. Stres ER-a uzrokuje dimerizaciju molekula PERK i trans-autofosforilaciju kinazne domene smještene u citosolu. Kinaza fosforilira eukariotski inicijacijski faktor translacije 2 (eIF2) što uzrokuje smanjenu stopu translacije, a samim time smanjen je unos proteina u već opterećeni ER. Fosforilacija eIF2 potiče sintezu transkripcijskog faktora ATF4 koji se veže na DNA i povećava ekspresiju proteina uključenih u antioksidativni odgovor i ekspresiju transkripcijskih faktora XBP1 i CHOP. XBP1 povećava sintezu šaperona, a CHOP svojim djelovanjem potiče apoptozu uslijed dugotrajnog stresa ER-a, sintezu proteina GADD34 koji sudjeluje u defosforilaciji eIF2 potrebnoj za ponovno odvijanje procesa translacije i sintezu oksidoreduktaze ERO1 $\alpha$  potrebne tijekom procesa smatanja proteina. Preuzeto i prilagođeno prema Walter & Ron, 2011.

Treći transmembranski senzorni protein ER-a koji inducira UPR kod Metazoa je ATF6. Nakon što luminalnom domenom detektira stres ER-a, ATF6 se pakira u transportne vezikule i prenosi do Golgijevog aparata. Tamo je podvrgnut proteolitičkom cijepanju proteazama S1P (engl. *site-1-protease*) i S2P (engl. *site-2-protease*). S1P prvo odcjepljuje luminalnu domenu, a potom S2P odcjepljuje transmembranski dio oslobađajući citosolni fragment proteina ATF6 koji sadrži motiv leucinskog zatvarača. Taj fragment migrira u jezgru, veže se na DNA i potiče ekspresiju ciljnih gena UPR-a kao što su šaperoni i komponente puta ERAD (Haze i sur., 1999; Ron & Walter, 2007). Dakle, mehanizam provođenja signala putem ATF6 je regulirana proteoliza tog proteina, što u konačnici rezultira povećanjem kapaciteta ER-a za smatanje proteina (Slika 5.).



Slika 5. Signalni put odgovora na nesmotane proteine preko senzornog proteina ATF6. Šaperon BiP disocira s proteina ATF6 i veže se na nakupljenje nesmotane proteine koji uzrokovali stres ER-a. ATF6 potom translocira u Golgijev aparat gdje ga cijepaju proteaze S1P i S2P oslobađajući njegov citosolni fragment koji odlazi u jezgru i potiče transkripciju šaperona, transkripcijskog faktora XBP1 i komponenti puta ERAD. Preuzeto i prilagođeno prema Park i sur., 2021.

U jezgri se ATF6 veže za element ERSE (engl. *ER stress response element*) u promotorskim regijama brojnih ciljnih gena UPR-a. Konsenzus sekvenca elementa ERSE je CCAAT-N<sub>9</sub>-CCACG (Yoshida i sur., 1998). ATF6 se veže za slijed CCACG u prisutnosti generalnog transkripcijskog faktora NF-Y (engl. *nuclear transcription factor Y*) koji je konstitutivno vezan za slijed CCAAT. ATF6 potiče i transkripciju gena *XBPI* čiji promotor također sadrži element ERSE, a i sam protein XBP1 se veže na taj slijed prilikom poticanja ekspresije ciljnih gena UPR-a (Yoshida i sur., 2000; Yoshida i sur., 2001).

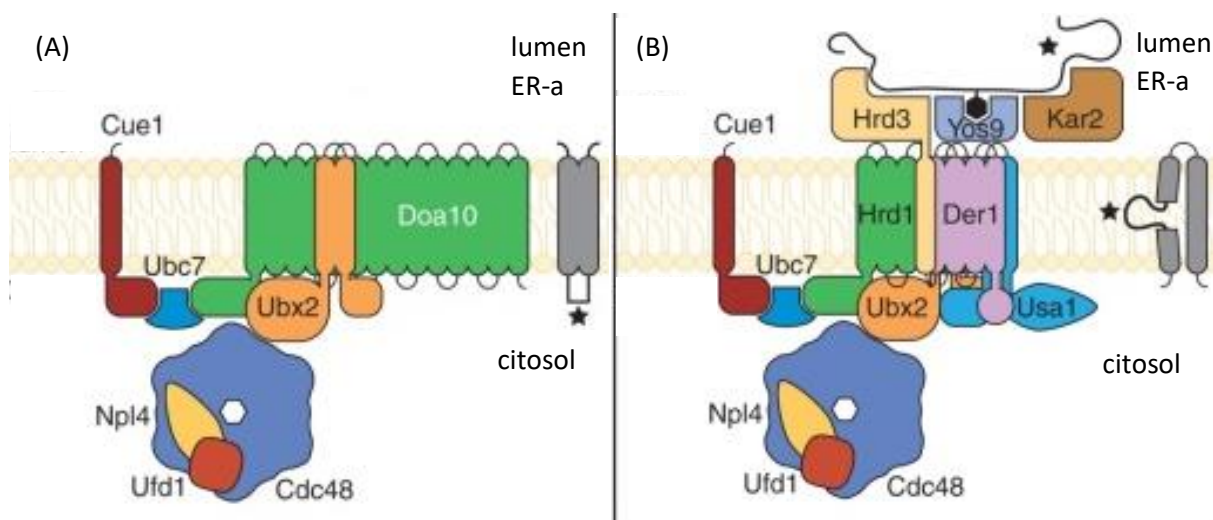
Osim što je aktivacija signalnih puteva predvođenih senzornim proteinima IRE1, PERK, ATF6 neophodna u savladavanju stresa izazvanog nakupljanjem nesmotanih proteina, važna je i za sam razvoj i diferencijaciju pojedinih dijelova organizma. Primjerice, signaliziranje putem IRE1-XBP1 potiče diferencijaciju B limfocita u plazma stanice povećanjem ER-a što omogućuje efikasnu sekreciju imunoglobulina (Mitra & Ryoo, 2019). Put PERK-eIF2 također je važan za funkciju sekretornih stanica kao što su  $\beta$  stanice gušterače koje luče inzulin te stanice koštanog sustava koje proizvode proteine ekstracelularnog matriksa (Zhang i sur., 2002).

### **3.2. Degradacija proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom**

Mehanizmi kontrole smatanja proteina u ER-u osiguravaju da samo ispravno smotani proteini napuste ER i transportiraju se do svog odredišta gdje obavljaju određenu funkciju, dok su oni ireverzibilno krivo smotani i oni koji se ne mogu smotati, npr. zbog mutacije ili uslijed nakupljanja prevelike količine proteina u ER-u s kojom se stanična mašinerija ne može nositi, eliminirani procesom degradacije povezane s ER-om (engl. *ER-associated protein degradation*, ERAD). Put ERAD generalno se odvija u nekoliko koraka: prepoznavanje proteina, retrotranslokacija u citosol, ubikvitinacija i proteasomalna degradacija. Nisu točno poznati svi načini na koje je prepoznat i selektiran supstrat za ERAD u odnosu na proteine koji su još u procesu smatanja, a prisutne su i druge nedoumice u odvijanju pojedinih koraka. Proces je konzerviran u organizmima od kvasca do ljudi, a povezanost nesmotanih proteina s brojnim bolestima ukazuje na iznimnu važnost njegovog funkcioniranja (Vembar & Brodsky, 2008).

### 3.2.1. Degradacija proteina povezana s ER-om kod kvasca

Ovisno o tome nalazi li se krivo smotani dio proteina u njegovoj citosolnoj, transmembranskoj ili luminalnoj domeni, protein je usmjeren prema jednom od tri membranska kompleksa ER-a koji definiraju tri grane puta ERAD prisutne kod kvasca: ERAD-C, ERAD-M i ERAD-L. Kompleksi su definirani s obzirom na ubikvitin ligazu E3 koju sadrže, a čija je funkcija transfer ubikvitina s konjugirajućeg enzima E2 na supstrat, što je signal za njegovu degradaciju. Put ERAD-C djeluje preko kompleksa Doa10, a putevi ERAD-M i ERAD-L preko kompleksa Hrd1. Ligaza Doa10 formira kompleks s proteinima Cue1, Ubc7, Cdc48, Npl4, Ufd1 i Ubx2, a ligaza Hrd1 uz navedene proteine asocira i s Hrd3, Der1, Yos9 i Usa1, s tim da Der1, Yos9 i Usa1 ne sudjeluju u putu ERAD-M (Slika 6.). U prepoznavanju supstrata sudjeluju šaperoni vezujući se na hidrofobne dijelove proteina, bilo one s greškom u citosolnoj ili luminalnoj domeni, a smatra se da su potrebni i dodatni signali. Na krivo smotani glikoprotein djeluje manozidaza ER-a Mns1 koja cijepa manozni ostatak grane B u strukturi glikana, a potom manozidaza Htm1 u kompleksu s PDI cijepa manozni ostatak grane C, što ostavlja izloženu manozu povezanu glikozidnom vezom  $\alpha(1\rightarrow6)$  na ostatak glikana koju prepoznaju proteini Hrd3 i Yos9. Oni vežu i neglikozilirane proteine s greškom u luminalnoj domeni i povezuju supstrate s ligazom Hrd1. U putu ERAD-M sam protein Hrd1 prepoznaje krivo smotane transmembranske dijelove. Nakon što su supstrati dovedeni do odgovarajućeg kompleksa, slijedi retrotranslokacija. Što sačinjava sam retrotranslokon, tj. kanal kroz koji se supstrat prebacuje iz lumena ER-a u citosol gdje se odvija ubikvitinacija i degradacija, nije sasvim razjašnjeno. Moguće je da sam translokon Sec61 obavlja tu funkciju ili protein Der1 koji je za kompleks Hrd1 vezan pomoću proteina Usa1. Predloženo je i da protein Hrd1 formira kanal i direktno retrotranslocira supstrate puta ERAD-L. Poliubikvitinacija je ključan korak za retrotranslokaciju. Protein Ubc7 je konjugirajući enzim E2 koji je na kompleks povezan pomoću membranskog proteina Cue1. Domena RING proteina Hrd1 i Doa10 ima ligaznu aktivnost i prihvaća ubikvitin od Ubc7 i prenosi ga na supstrat. Protein Cdc48 je AAA+ ATPaza koja formira kompleks s proteinima Ufd1 i Npl4 i potiče pomicanje ubikvitiranog supstrata u citosol hidrolizom ATP-a. Kompleks je usidren u membranu ER-a kroz interakciju s proteinom Ubx2. Na supstrat je potom dodano još nekoliko molekula ubikvitina djelovanjem enzima Ufd2 čime postaje poliubikvitiran i kao takav je prepoznat od strane proteina Rad23 i prenesen do proteasoma 26S gdje je degradiran na manje fragmente. Glikoziliranim supstratima su prije razgradnje uklonjeni šećerni ostaci djelovanjem proteina Png1 (Thibault & Ng, 2012).



Slika 6. Shematski prikaz kompleksa Doa10 (A) i kompleksa Hrd1 (B) s njihovim glavnim komponentama koje sudjeluju u degradaciji proteina povezanoj s ER-om. Zvijezdica označava krivo smotani dio proteina, a šesterokut manozni ostatak. Preuzeto i prilagođeno prema Thibault & Ng, 2012.

### 3.2.2. Degradacija proteina povezana s ER-om kod Metazoa

Sustav ERAD kod Metazoa kompleksniji je nego u kvasca budući da su organizmi sami po sebi kompleksnije građe i imaju znatno opsežniji proteom, ali osnovne komponente i princip djelovanja je isti. Postoji mnogo ubikvitin ligaza E3 oko kojih su formirani membranski kompleksi koji provode ERAD i svaka upravlja degradacijom određenog seta supstrata. Neke od njih su HRD1, GP78, RMA1, TEB4. U prepoznavanju supstrata za ERAD također sudjeluju šaperoni. Glikoproteinima koji se ne mogu smotati pomoću lektinskih šaperona uklanjaju se dva terminalna manozna ostatka djelovanjem enzima manozidaza ER-a I i EDEM1. Terminalnu manozu povezanu glikozidnom vezom  $\alpha(1\rightarrow6)$  na ostatak glikana prepoznaju proteini OS9 i XTP3-B, homologe proteina Yos9. OS9 i XTP3-B u interakciji s šaperonom BiP sudjeluju i u prepoznavanju neglikoziliranih proteina. Adaptorski proteini kao što su SEL1L, Insig-1 i Erlin1/2 povezuju faktore prepoznavanja s retrotranslokomom i ligazom. Formira li kanal za retrotranslokaciju sama ligaza, protein Der1 ili pak sam translokon Sec61, također nije poznato. Energija za pomicanje supstrata iz lumena ER-a u citosol potječe od hidrolize ATP-a djelovanjem citosolne AAA+ ATPaze VCP koja je za ligazni kompleks je vezana pomoću membranskog proteina VIMP. Pri prijelazu u citosol, supstrat je poliubikvitiran, prenesen do proteina Rad23. Glikani su uklonjeni pomoću proteina Png1, poliubikvitin je skraćen djelovanjem proteina Atx3 i takav supstrat doveden je do proteasoma 26S i degradiran (Olzmann i sur., 2013; Vembar & Brodsky, 2008). Citosolna

ligaza E3 CHIP posreduje u procesu degradacije tako što ubikvitira terminalno krivo smotane proteine vezane na citosolne šaperone (Murata i sur., 2001). U stanicama Metazoa prisutan je i mehanizam kotranslokacijske degradacije kojim košaperon P58<sup>IPK</sup> potiče vezanje šaperona Hsp70 na proteine čija je translokacija usporena uslijed stresa ER-a. Posljedično je spriječena daljnja translokacija i protein je usmjeren prema proteasomu čime je smanjeno opterećenje ER-a (Oyadomari i sur., 2006). Brojne druge komponente također su uključene u sustav ERAD, a uloge i mehanizam djelovanja mnogih tek trebaju biti otkriveni.

## 4. Zaključak

Promjene normalnih staničnih uvjeta između ostalog mogu dovesti i do smanjenja efikasnosti smatanja proteina. Pogreške prilikom smatanja i nakupljanje krivo smotanih proteina u stanici imaju negativne posljedice na ljudski organizam. Stres ER-a dovodi do aktivacije UPR-a i ERAD-a. Kronični stres ER-a, nepravilna aktivnost UPR-a i apoptoza posredovana djelovanjem UPR-a doprinose nastanku mnogih bolesti ljudskog organizma uključujući neurodegeneraciju, dijabetes, aterosklerozu i tumore. Akumuliranje proteinskih agregata u tkivima uzrokuje razvoj neurodegenerativnih bolesti uključujući Alzheimerovu, Parkinsonovu i Huntingtonovu bolest. Gubitak funkcije proteina PERK uzrokuje Wolcott–Rallisonov sindrom, autosomnu recesivnu bolest okarakteriziranu neonatalim dijabetesom tipa I. S druge strane, hiperaktivnost UPR-a doprinosi proliferaciji tumorskih stanica koje zbog brzog rasta imaju veću potrebu za sastavljanjem proteina (Oakes & Papa, 2015; Ozcan & Tabas, 2012; Scheper & Hoozemans, 2015; Wang & Kaufman, 2012). Budući da su sva tri signalna puta UPR-a međusobno isprepletena i da aktivnost jednog utječe na aktivnost drugog, komponente UPR-a koje bi potencijalno mogle biti mete za tretiranje ljudskih bolesti, terapeutici i način njihova djelovanja moraju biti precizno testirani i odabrani.

## 5. Literatura

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (6. izdanje). New York: Garland Science

Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223–230.

Araki, K., & Nagata, K. (2011). Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(11), a007526.

Back, S. H., Schröder, M., Lee, K., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2005). ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods*, 35(4), 395–416.

Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353(6294), aac4354.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2007). *Biochemistry* (6. izdanje). New York: W.H. Freeman.

Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a013201.

Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2012). Unfolded protein response. *Current Biology*, 22(16), 622–626.

Chakrabarti, A., Chen, A. W., & Varner, J. D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering*, 108(12), 2777–2793.

Coelho, D. S., & Domingos, P. M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Frontiers in genetics*, 5, 76.

Cox, J. S., & Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 87(3), 391–404.

Cox, J. S., Chapman, R. E., & Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular biology of the cell*, 8(9), 1805–1814.



- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., & Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18773–18784.
- Ellgaard, L., McCaul, N., Chatsisvili, A., & Braakman, I. (2016). Co- and post-translational protein folding in the ER. *Traffic*, 17(6), 615–638.
- Gardner, B. M., & Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, 333(6051), 1891–1894.
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A., & Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature cell biology*, 15(5), 481–490.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571–580.
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852–1858.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell*, 10(11), 3787–3799.
- Hebert, D. N., & Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological reviews*, 87(4), 1377–1408.
- Hendershot L. M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai journal of medicine*, 71(5), 289–297.
- Hetz, C., Zhang, K. & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 421–438.
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., & Weissman, J. S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology*, 186(3), 323–331.
- Kleizen, B., & Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 343-349.

- Korennykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Stroud, R. M., & Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*, 457(7230), 687–693.
- Lee, K. P., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T. E., & Sicheri, F. (2008). Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell*, 132(1), 89–100.
- Melnick, J., Dul, J. L., & Argon, Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 370(6488), 373–375.
- Mitra, S., & Ryoo, H. D. (2019). The unfolded protein response in metazoan development. *Journal of cell science*, 132(5), jcs217216.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., & Tanaka, K. (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO reports*, 2(12), 1133–1138.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2012). *Lehninger Principles of Biochemistry* (6. izdanje). W. H. Freeman.
- Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual review of pathology*, 10, 173–194.
- Olzmann, J. A., Kopito, R. R., & Christianson, J. C. (2013). The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9), a013185.
- Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E. A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H. P., Goodman, A. G., Harant, H., Garrison, J. L., Taunton, J., Katze, M. G., & Ron, D. (2006). Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell*, 126(4), 727–739.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., & Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306(5695), 457–461.
- Ozcan, L., & Tabas, I. (2012). Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annual review of medicine*, 63, 317–328.

Park, S. M., Kang, T. I., & So, J. S. (2021). Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. *Biomedicines*, 9(7), 791.

Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 519–529.

Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. A., & Majsterek, I. (2016). The role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. *Current molecular medicine*, 16(6), 533–544.

Rubio, C., Pincus, D., Korennykh, A., Schuck, S., El-Samad, H., & Walter, P. (2011). Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *The Journal of cell biology*, 193(1), 171–184.

Rüegsegger, U., Leber, J. H., & Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell*, 107(1), 103–114.

Scheper, W., & Hoozemans, J. J. (2015). The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta neuropathologica*, 130(3), 315–331.

Sidrauski, C., Cox, J. S., & Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 87(3), 405–413.

Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90(6), 1031–1039.

Thibault, G., & Ng, D. T. (2012). The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a013193.

Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., & Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101(3), 249–258.

Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2012). IRE1 $\alpha$  cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*, 338(6108), 818–822.

- Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12), a004390.
- Vattem, K. M., & Wek, R. C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11269–11274.
- Vembar, S., & Brodsky, J. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 944–957.
- Walter P, & Ron D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081–1086.
- Wang, S., & Kaufman, R. J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of cell biology*, 197(7), 857–867.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *The Journal of biological chemistry*, 273(50), 33741–33749.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 20(18), 6755–6767.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881–891.
- Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K., & Cavener, D. R. (2002). The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Molecular and cellular biology*, 22(11), 3864–3874.

Zhou, J., Liu, C. Y., Back, S. H., Clark, R. L., Peisach, D., Xu, Z., & Kaufman, R. J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14343–14348.

## 6. Životopis

Rođena sam 13.07. 2000. godine u Splitu. Od 2007. do 2015. godine pohađala sam Osnovnu školu Pirovac. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u Gimnaziji Antuna Vrančića u Šibeniku koju sam pohađala od 2015. do 2019. godine. Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2019. godine. Članica sam Udruge studenata biologije (BIUS) od 2021. godine.