

Uloge proteasomalne razgradnje u razvoju biljaka

Belamarić, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:217:224563>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Andrea Belamarić

**Uloge proteasomalne razgradnje u razvoju
biljaka**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Andrea Belamarić

**The role of proteasomal degradation in plant
development**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dunje Leļjak-Levanić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Uloga proteasomalne razgradnje u razvoju biljaka

Andrea Belamarić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ravnoteža proteoma ključna je za život svih organizama. Glavnu ulogu u razgradnji proteina kod eukariota ima sustav proteasoma 26S. Unatoč iznimnoj konzerviranosti kod eukariota, brojna istraživanja ukazuju na složenost i dinamičnost ovog sustava u biljaka. Jedan od razloga je važnost brzog prilagođavanja biljaka na promjenjivost okoliša. Proteasomalni kompleks u biljaka sastoji se od središnje i regulatorne podjedinice koje funkcioniraju zajednički. U biljaka se proteini usmjeravaju u razgradnju dodatkom ubikvitina. Kako bi se proteinu dodala ubikvitinska oznaka, potrebni su enzimi ubikvitin ligaze E1, E2 i E3. Broj pojedinog tipa ligaza u stanici ovisi o funkciji koju obavljaju, a najbrojnije su ligaze E3 koje pokazuju i najveću specifičnost prema supstratima koje označavaju za razgradnju. Sustav proteasomalne razgradnje regulira različite procese u biljnom razvoju, odgovoru na stres, signalizaciji i razvoju plastida. Ovaj rad pruža uvid u kompleksnost sustava razgradnje proteina u biljaka te predstavlja nekoliko konkretnih primjera uloge ovog sustava u biljnom metabolizmu.

Ključne riječi: proteasomalna razgradnja, obrt proteina, razvoj biljaka, stres u biljaka, biljni hormoni, regulacija transkripcije

(25 stranica, 5 slike, 0 tablica, 69 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

The role of proteasomal degradation in plant development

Andrea Belamarić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The balance of the proteome is essential for the life of all organisms. The 26S proteasome system is the main mechanism of protein degradation. Plant proteasomes play an irreplaceable role in rapid adaptation of plants to environmental changes. The proteasomal complex in plants consists of a central and a regulatory subunit that function together. In plants, proteins are directed to degradation by the addition of ubiquitin. To add the ubiquitin tag to the protein, the ubiquitin ligase enzymes E1, E2 and E3 are needed. The number of each type of ligase in the cell depends on the function they perform, and the most numerous are the E3 ligases, which show the highest specificity for the substrates they mark for degradation. The proteasomal degradation system regulates various processes in plant development, stress response, signaling and plastid development. This paper provides an insight into the complexity of the protein breakdown system in plants and presents several concrete examples of the role of this system in plant metabolism.

Keywords: proteasomal degradation, protein turnover, plant development, stress in plants, plant hormones, transcription regulation

(25 pages, 5 figures, 0 tables, 69 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leļjak-Levanić

Sadržaj

1. Obrt proteina u biljnim stanicama.....	1
1.1. Regulacija sinteze proteina	1
1.2. Regulacija razgradnje proteina	2
2. Razgradnja proteina na proteasomima.....	3
2.1. Građa i funkcija proteasoma	3
2.2. Regulacija i stanična lokalizacija proteasoma	5
2.3. Ubikvitinacija proteina	6
2.4. Ubikvitin i E3 ligaze	8
3. Uloga proteasoma u biljaka.....	10
3.1. Uloga proteasoma u odgovoru na stres u biljaka	10
3.1.1. Abiotički stres.....	10
3.1.2. Biotički stres.....	13
3.2. Uloga proteasomalne razgradnje u razvoju kloroplasta	14
3.3. Regulacija razvoja ovisnog o svjetlu.....	15
4. Zaključak	17
5. Literatura.....	18
6. Životopis.....	25

1. Obrt proteina u biljnim stanicama

Stanice svih organizama, pa tako i biljaka, imaju vrlo raznolik sastav proteina. Proteini se sintetiziraju u citosolu, mitohondrijima i kloroplastima. Unatoč činjenici da je proizvodnja proteina za stanicu iznimno energetska zahtjevan proces, proteini se neprestano sintetiziraju i razgrađuju. Ravnoteža razgradnje i sinteze proteina omogućava prilagođavanje staničnih funkcija okolišu, što rezultira boljim preživljavanjem cijelog organizma. Budući da su sesilni organizmi, biljakama je iznimno važno brzo se prilagoditi okolišu. Upravo fina regulacija sustava za sintezu i razgradnju proteina omogućava prilagodbu stanica promijenjenim uvjetima.

Različiti mehanizmi u stanici reguliraju sintezu proteina, a isto vrijedi i za razgradnju. Sinteza proteina regulirana je na transkripcijskoj, posttranskripcijskoj i posttranslacijskoj razini. Stupanj razgradnje ovisi o funkciji proteina, lokalizaciji u stanici (Xu & Xue, 2019), interakciji s drugim proteinima, kao i o vezanju kofaktora (Nelson & Millar, 2015), dok se proteini razgrađuju proteazama i sustavom proteasoma, a moguća je i razgradnja autofagijom. Ne smije se zanemariti ni utjecaj energetskog statusa stanice na stopu sinteze proteina.

1.1. Regulacija sinteze proteina

Razina transkripcije pojedinih gena ovisi o aktivnosti transkripcijskih faktora, koaktivatora i enzima za modifikaciju kromatina. Na strukturu kromatina utječe metilacija DNA i modifikacije histona. Transkripcijska regulacija sinteze proteina kod biljaka često je pod utjecajem signalnih putova, na koje utječu hormoni ili svjetlost (Macrae & Long, 2012). Osim na razini transkripcije, količina proteina u stanici regulirana je posttranskripcijski. Posttranskripcijska regulacija odnosi se na sekundarnu strukturu mRNA i dužinu poliA repa. U kloroplastima postoji poseban mehanizam regulacije translacije svjetlošću, pri čemu u mraku ne dolazi do translacije (Nelson & Millar, 2015). Posttranslacijske modifikacije, koje uključuju fosforilaciju i ubikvitinaciju za koje su potrebni enzimi, ali i neenzimske procese kao što je npr. karbonilacija, utječu na stabilnost i aktivnost proteina.

1.2. Regulacija razgradnje proteina

Proteaze su enzimi koji cijepaju i razgrađuju oštećene, denaturirane i agregirane proteine, čime se oslobađaju aminokiseline za sintezu novih proteina (D'Ippólito et al., 2021). Nadalje, proteolitičko cijepanje može aktivirati novosintetizirane enzime ili odcjepljivanjem kraja proteina usmjeriti njegov transport u pojedine organele (Schaller, 2004). Kod uročnjaka je za sada identificirano 826 proteaza (Van Der Hoorn, 2008), a nalaze se u citosolu, mitohondrijima, kloroplastima i litičkim vakuolama (Xu & Xue, 2019). S obzirom na mehanizam djelovanja, glavne skupine proteaza su serinske, cisteinske, aspartat-proteaze i metaloproteaze (Schaller, 2004). Razgradnja proteazama uvjetuje razvoj puči, odgovor na hormone, mobilizaciju proteina tijekom klijanja, obranu od patogena (Van Der Hoorn & Jones, 2004) i inicijaciju stanične smrti (Schaller, 2004). Iako proteaze pokazuju specifičnost prema supstratima i određenu razinu regulacije (Van Der Hoorn, 2008), točna funkcija kao ni supstrati velikog broja proteaza još nisu poznati (Demir et al., 2018).

Proteasom je velik proteinski kompleks s proteaznom aktivnošću koji ima glavnu ulogu u razgradnji proteina u stanici. U stanici se 80–90% proteina razgradi upravo sustavom proteasoma (Xu & Xue, 2019). Proteasom je složen kompleks građen od velikog broja podjedinica. Na primjer, kod vrste *Arabidopsis thaliana* na komponente proteasomalnog sustava otpada oko 6% cjelokupnog proteoma stanice (Vierstra, 2009). Djelovanje proteasomalnog sustava ima učinak na biljni rast i razvoj, kao i na prilagođavanje stresnim uvjetima.

Razgradnja organela ili njihovih komponenti može se odvijati i procesom autofagije. Kod makroautofagije sadržaj koji ide u razgradnju obavlja se dvostrukom membranom, pri čemu nastaje autofagosom, koji zatim fuzionira s membranom vakuole te se razgrađuje proteazama u litičkoj vakuoli. S druge strane, mikroautofagija ne uključuje stvaranje autofagosoma, već dolazi do direktnog unošenja organela ili proteina u vakuolu invaginacijom membrane gdje ih razgrađuju enzimi vakuole (Yoshimoto, 2012). Autofagija često nastupa kao odgovor na stres te služi za otklanjanje toksičnih komponenti (Nelson & Millar, 2015).

2. Razgradnja proteina na proteasomima

2.1. Građa i funkcija proteasoma

Ključan dio proteasoma 26S je podjedinica 20S koja se još naziva i središnjom podjedinicom (engl. *core particle* – CP). Njena je uloga katalitička. Nadalje, kompleks proteasoma 26S ima jednu ili dvije podjedinice 19S koje imaju regulatornu ulogu (engl. *regulatory particle* – RP), koja uključuje prepoznavanje supstrata za razgradnju i njihovo navođenje u središnju podjedinicu kako bi se razgradili. Svaka podjedinica 19S vezuje se za jedan kraj središnje podjedinice 20S te zajedno čine proteasom 26S (Jung et al., 2009). Kompleks proteasoma ovisan je o ATP-u (Thomson et al., 2020).

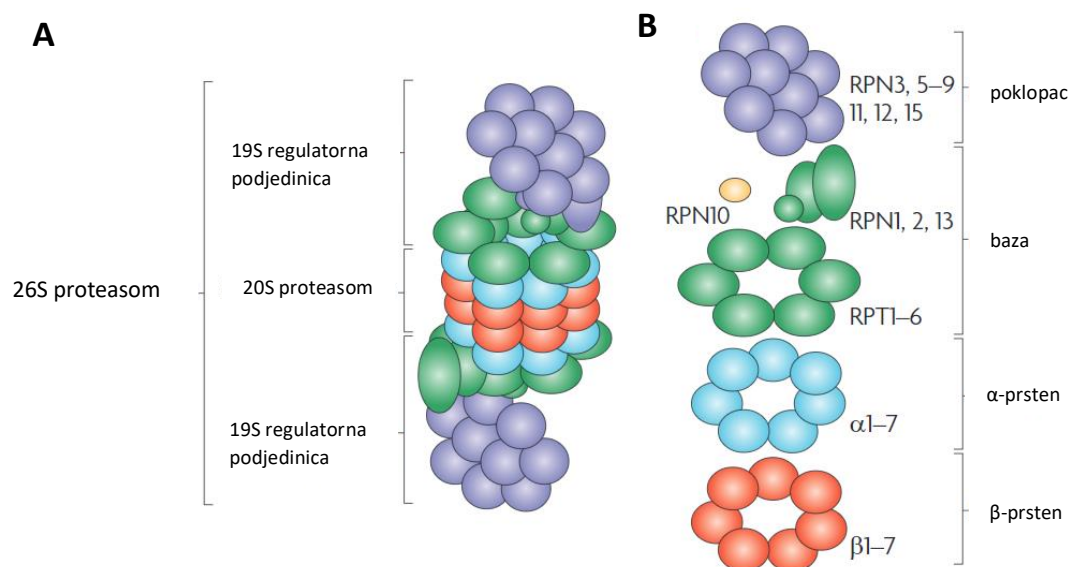
Podjedinica 20S građena je od četiri aksijalno postavljene heteroheptamernih prstenova, a strukturom podsjeća na bačvu. Vanjske podjedinice su građene od dva α -prstena, a unutarnje od dva β -prstena. Prstenovi α stvaraju poru koja regulira ulazak supstrata u katalitičku komoru, a kasnije izbacuje produkte koji nastaju razgradnjom. Vanjski α -prsteni građeni su od sedam manjih podjedinica ($\alpha 1$ - $\alpha 7$). Beta prstenovi također su građeni od sedam različitih podjedinica ($\beta 1$ - $\beta 7$) koje se nalaze između α -podjedinica – jedan do drugoga, dok se α -podjedinice nalaze s vanjske strane (Slika 1). Neke β -podjedinice sadrže proteolitički aktivna mjesta koja imaju određenu proteolitičku aktivnost, uglavnom tripsinsku ili kaspaznu. (Livneh et al., 2016).

Podjedinica 19S građena je od tzv. "baze" i "poklopca", koji se sastoje od podjedinica Rpn (engl. *regulatory particle of non-ATPase*) i Rpt (engl. *regulatory particle of triple-ATPase*), pri čemu podjedinice Rpt imaju ATP-aznu aktivnost, a podjedinice Rpn nemaju (Slika 1).

Rpn10 i Rpn13 su ubikvitinski receptori te imaju ključnu ulogu u prepoznavanju ubikvitiniranih supstrata. Tijekom razgradnje djeluju i deubikvitinaze. To su enzimi koji, nakon prepoznavanja supstrata, uklanjaju ubikvitinsku oznaku. Najvažniju ulogu u deubikvitinaciji supstrata pri razgradnji ima podjedinica Rpn11 (Sakata et al., 2012). Rpt3 i Rpt5 sudjeluju u otvaranju pore koju stvara prsten građen od α -podjedinica (Tanaka, 2009). U regulaciji ulaska supstrata najvažniju ulogu ima podjedinica $\alpha 3$ proteasomalne podjedinice 20S. Eksperimentalno je pokazano da delecija gena za podjedinicu $\alpha 3$ dovodi do uvijek otvorene pore (Groll et al., 2000).

Iako je većina istraživanja proteasoma 26S provedena na modelu kvasca, nedavno je potvrđeno da je ova struktura visoko konzervirana kod eukariota. Građa biljnog proteasoma 26S odgovara građi kvašćeva proteasoma. Unatoč tome, proteasomi su u strukturnom smislu vrlo heterogeni. Uzrok heterogenosti su duplikacije gena za podjedinice Rpn, Rpt, α i β , što rezultira postojanjem većeg broja izoformi (Yang et al., 2004). Heterogenosti svakako pridonose i posttranslacijske modifikacije podjedinica Rpn, Rpt, α i β , koje uključuju fosforilaciju, acetilaciju i ubikvitinaciju (Hirano et al., 2016), što uvjetuje specifičnost procesa razgradnje (Kurepa & Smalle, 2008).

Proteasomi kod arheja još nisu dobro istraženi. Njihovo proučavanje otežava nestabilnost ovih kompleksa, no nedavno je krioelektronskom mikroskopijom nešto detaljnije proučena njihova struktura. Arhejski proteasomi imaju samo podjedinicu CP i podjedinicu s ATP-aznom aktivnošću. Nemaju, dakle, složenu regulatornu podjedinicu kao što je slučaj kod potpunog 26S proteasoma. (Majumder et al., 2019)



Slika 1: Shematski prikaz građe proteasoma 26S. (A) Proteasom 26S je građen od proteasoma 20S (dva plava α -prstena i dva crvena β -prstena) i regulatorne podjedinice 19S; (B) Proteasom 20S čine prstenovi α i β dok regulatornu podjedinicu 19S koja se sastoji od „poklopca“ i „baze“ čine podjedinice Rpn i Rpt. Podjedinica Rpn10 smještena je upravo između „poklopca“ i „baze“. Slika je preuzeta iz rada Murata et al. (2009).

Najnovija istraživanja pokazuju da regulatorna podjedinica 19S prolazi kroz različita konformacijska stanja pri obavljanju svoje funkcije. Podjedinica može poprimiti konformacije s1-s4, pri čemu se stanja s1 i s4 međusobno najznačajnije razlikuju. U kvascima *in vitro* najčešće su

konformacije s1 i s3, gdje s1 odgovara konformaciji bez supstrata, a s3 konformaciji za vrijeme razgradnje supstrata (Bard et al., 2018).

Iako se dugo smatralo da 20S podjedinica proteasoma nema funkciju ukoliko nije u interakciji s regulatornom podjedinicom 19S, novija istraživanja pokazuju da nije tako. U većem broju eukariotskih organizama pronađene su slobodne podjedinice 20S proteasoma, a smatra se da sudjeluju u razgradnji proteina koji su pretrpjeli oksidativna oštećenja. Takav tip razgradnje je neovisan o ATP-u (Yang et al., 2004).

2.2. Regulacija i stanična lokalizacija proteasoma

Teško je procijeniti stupanj sinteze pojedinih podjedinica koje čine kompleks 19S i 20S jer se nakon sklapanja one koje su ostale slobodne vrlo brzo razgrade. Inhibicija sinteze svih podjedinica kompleksa proteasoma 26S odvija se kooperativno. Stanica ima različite mehanizme kojima „osjeća“ razinu proteasomalne razgradnje koja se trenutno odvija. Ukoliko je aktivnost proteasoma inhibirana nekim inhibitorom, pojačava se sinteza gena za podjedinice proteasoma kako bi se ponovno uspostavila potrebna stopa razgradnje proteina (Yang et al., 2004). Smanjena aktivnost proteasoma dovest će do nakupljanja oštećenih proteina koji predstavljaju stres za stanicu. Kada ukupna sinteza proteina u stanici nije jako aktivna, tada je i potreba za proteasomalnom razgradnjom smanjena, pa se razina ekspresije gena za podjedinice proteasoma smanjuje (Kurepa & Smalle, 2008).

Ekspresija gena za podjedinice proteasoma 20S i proteasoma 19S kod vrste *Saccharomyces cerevisiae* je pod kontrolom transkripcijskog faktora Rpn4. Protein Rpn4 nije podjedinica proteasome 19S, već transkripcijski aktivator. Smanjenje aktivnosti proteasoma dovodi do povišene koncentracije proteina Rpn4, koja se nakon smanjenja transkripcije vraća na prijašnju koncentraciju. Za aktivaciju proteasomalnih gena kod kvasaca ključna je PACE sekvenca (engl. *proteasome-associated control element*) koja se nalazi ispred gena za podjedinice proteasoma, a prepoznaje ju upravo Rpn4 (Mannhaupt et al., 1999). Rpn4 je kratkoživući protein kojega također razgrađuje proteasomalni sustav, a razgradnja može biti ovisna ili neovisna o ubikvitinu (Xie & Varshavsky, 2001). Ekspresiju transkripcijskog aktivatora Rpn4 pojačavaju transkripcijski faktori koji se induciraju u stresu, od kojih su neki faktor oksidativnog stresa YAP1 (engl. *yes-associated*

protein 1) i *heat-shock* faktor HSF1 (engl. *heat shock transcription factor 1*) (Ma & Liu, 2010). Kod višestaničnih eukariota je ekspresija gena za podjedinice proteasoma također regulirana transkripcijskim faktorima, pri čemu je uključeno više njih, ali nema homologa s Rpn4. Kod nekih vrsta je ipak prisutan samo jedan transkripcijski aktivator. Na primjer, kod vrste *Caenorhabditis elegans* regulacija proteasoma ovisi isključivo o faktoru SKN-1 (Pickering et al., 2013).

Kod sisavaca ključnu ulogu u aktivaciji ekspresije gena proteasoma ima transkripcijski faktor Nrf1 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 1*), kojeg ubikvitinira više od jedne E3 ligaze. Nrf1 je protein vezan za endoplazmatski retikulum, a njegov ulazak u jezgru aktivira transkripciju, za što su potrebne dodatne modifikacije – deglikozilacija, ubikvitinacija i procesiranje. Radi se o tipu TF-a leucinskom zatvaraču (engl. *leucine zipper*) koji se specifično veže na elemente ARE (engl. *antioxidant response elements*) u promotorima ciljnih gena, odnosno gena za podjedinice proteasome (Radhakrishnan et al., 2010). ARE su pojačivačke sekvence koje djeluju *in cis*, a utječu na transkripcijsku aktivaciju gena u stanicama kada su izložene oksidativnom stresu (Nguyen et al., 2003). Protein Nrf2, homolog transkripcijskog aktivatora Nrf1, dodatno može biti potaknut oksidacijskim stresom koji se očituje kroz visoku koncentraciju antioksidansa (Malloy et al., 2013).

Posttranslacijske modifikacije kompleksa proteasome su vrlo učestale. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je 345 različitih modifikacija prepoznatno kod proteasoma, a najčešće se radi o fosforilacijama, acetilacijama, ubikvitinacijama koje utječu na aktivnost kompleksa, vezanje supstrata, stabilnost i ATP-aznu aktivnost (Hirano et al., 2016). Na nekim mjestima moguće je više modifikacija, što omogućava „komunikaciju“ između modifikacija (Zong et al., 2014).

Kompleks proteasoma u stanicama se nalazi u jezgri i u citoplazmi, iako ga ima više u jezgri. Ta činjenica ukazuje na važnost obrta jezgrinih proteina, a zajednička je svim eukariotima. Za vrijeme stanične diobe, primijećen je povećan sadržaj proteasoma u području jezgrine ovojnice, diobenog vretena, preprofazne vrpce i fragmoplasta (Yanagawa et al., 2002).

2.3. Ubikvitinacija proteina

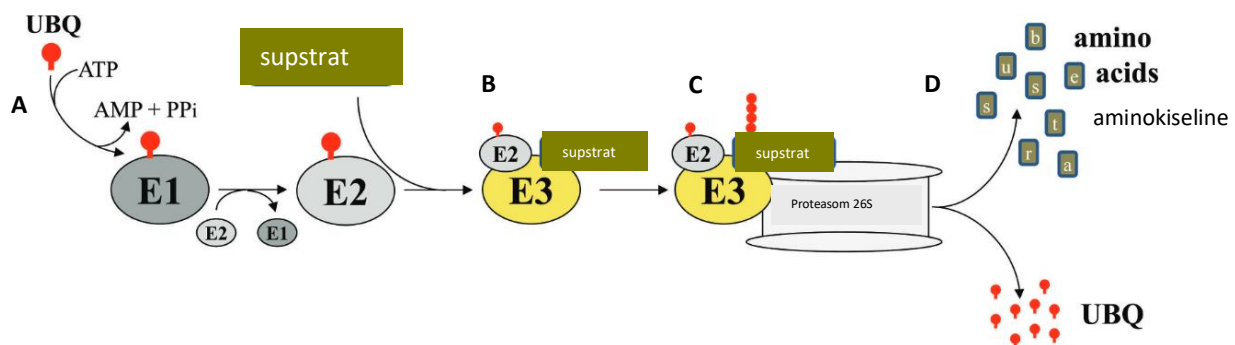
Kako bi protein mogao biti razgrađen proteasomalnim sustavom, potrebno ga je označiti ubikvitinom, odnosno poliubikvitinskim lancem. Poliubikvitinacija je univerzalan signal za

razgradnju kod eukariota. Ubikvitin je mali protein sa samo 76 aminokiselina. Ima sedam karakterističnih lizinskih ogranaka kojima se može povezati sa supstratom ili drugim ubikvitinom. Ubikvitin je visoko konzerviran kod svih eukariota (Callis, 2014).

Proces započinje aktivacijom ubikvitina. Enzim za aktivaciju ubikvitina (E1) uz utrošak ATP-a vezuje ubikvitin. Tako aktivirani ubikvitin stupa u interakciju s enzimom za konjugaciju ubikvitina (E2) koji se zatim udružuje s ubikvitin ligazom (E3), čime se katalizira prebacivanje ubikvitinskog monomera na lizinski ogranak proteina predviđenog za razgradnju (Kurepa & Smalle, 2008). Proteosomalna razgradnja ubikvitiniranih supstrata uključuje prepoznavanje lanca, micanje ubikvitinske oznake, odmatanje proteina uz utrošak ATP-a i proteolitičku razgradnju (Wang & Spoel, 2022).

Ubikvitin se dodaje tako što se C kraj glicina na ubikvitinu vezuje za ϵ -amino skupinu lizina u supstratu. Svaki sljedeći ubikvitin moguće je dodati na neki od sedam lizinskih ogranaka u prethodnom ubikvitinu ili na N-terminalnu skupinu prvog metionina (Komander & Rape, 2012).

Također, kod eukariota je moguća proteosomalna razgradnja bez ubikvitinacije. To je slučaj kod enzima kao što su ornitin-dekarboksilaza, timidilat-sintaza te transkripcijskog aktivatora Rpn4. Može se zaključiti da su proteasomi evolucijski stariji od ubikvitina. Proteasomi 20S prisutne su kod svih arheja i eukariota, te kod nekih bakterija, dok je sustav za ubikvitinaciju specifičan za eukariote (Erales & Coffino, 2014).



Slika 2: Proces obilježavanja supstrata ubikvitinom i usmjeravanje u razgradnju. (A) Ligaza E1 vezuje ubikvitin uz utrošak ATP-a. (B) Ligaza E2 preuzima ubikvitin te stupa u interakciju s ligazom E3. (C) Ligaza E3 prenosi ubikvitin na supstrat. Ovaj se ciklus može ponavljati, pri čemu nastaje poliubikvitinirani supstrat. (D) Kompleks proteasome 26S razgrađuje protein na aminokiseline, a ubikvitin se oslobađa i ponovno koristi. UBQ – ubikvitin. Slika je preuzeta iz rada Chen & Hellmann (2013).

2.4. Ubikvitin i ligaze E3

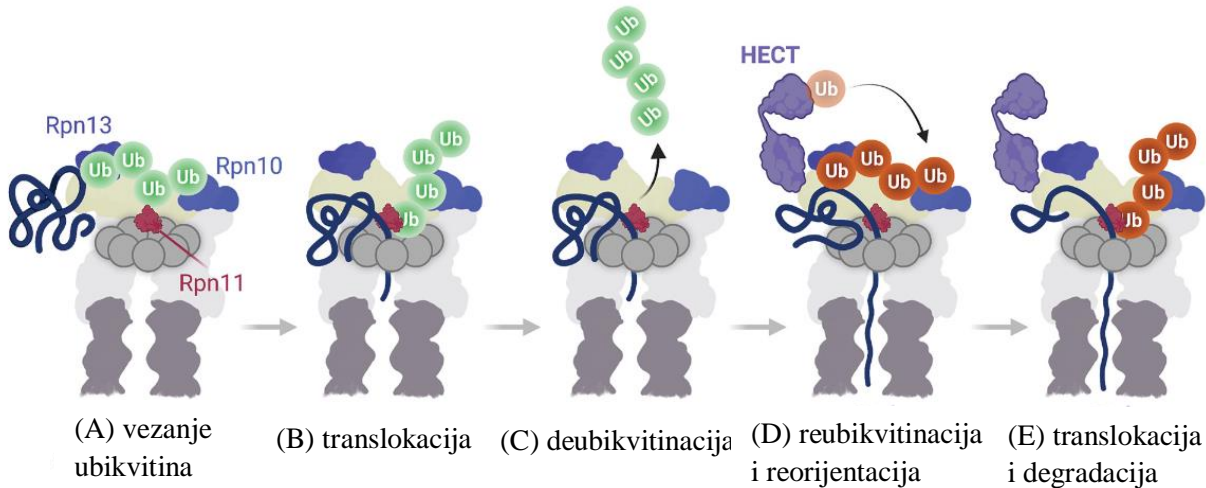
E3-ligaze su klasa enzima čija je uloga prepoznavanje proteina predviđenih za razgradnju i kataliza reakcije ligacije ubikvitina s proteinima. U stanicama vrste *A. thaliana* nalazi se više od 1600 različitih komponenti sustava proteasomalne razgradnje, od čega čak 90% otpada na različite ligaze E3 (Vierstra, 2009). Kod vrste *Arabidopsis thaliana* prisutan je jedan lokus koji kodira ligazu E1, četrdesetak gena za ligazu E2, a procjenjuje se da bi različite E3-ligaze moglo kodirati čak 1400 gena (Nelson & Millar, 2015). Geni koji kodiraju ligaze E1 su konstitutivno eksprimirani u svim tkivima.

Osim u citosolu, ligaze E3 mogu biti aktivne i u plastidima. Protein SP1, E3-ligaza iz skupine RING-ligaza kod vrste *Arabidopsis thaliana* nalazi se u vanjskoj ovojnici plastida, a ima ulogu u poticanju deetioloacije. Budući da protein SP1 okrenuta prema citosolu, omogućava interakciju plastida s proteasomom 26S i usmjeravanje određenih komponenti plastida u razgradnju, što dovodi do razvoja kloroplasta (Ling et al., 2012).

Unatoč dobro istraženom mehanizmu djelovanja ligaza E3, ostaje više područja zanimljivih za daljnje istraživanje. Neka od njih su svakako faktori koji reguliraju interakciju supstrata s ligazom E3, kao i usporedba monoubikvitinacije i poliubikvitinacije, te aktivnost ligaza s obzirom na stanični ciklus (Chen & Hellmann, 2013).

Ligaze E3 u biljaka dijele se u tri klase HECT, RING i U-box. HECT ligaze sadrže konzerviranu HECT domenu u kojoj se nalazi cisteinski ogranak na kojem se temelji mehanizam rada ovog enzima. Ubikvitin se tioesterskom vezom veže za cistein u aktivnom mjestu enzima prije nego što se prebacuje na supstrat (Huibregtse et al., 1995). Obično se radi o velikim proteinima od oko 100 kDa, a skupina je manje raznolika od preostale dvije. Kod vrste *Arabidopsis thaliana* okarakterizirano je sedam HECT ligaza pod nazivima UPL1 do UPL7, a imaju različite uloge u stanici (Downes et al., 2003). Neke HECT ligaze nalaze se uz proteasomalni kompleks te imaju sposobnost ponovno ubikvitinirati supstrat, olakšavajući time proces razgradnje (Wang & Spoel, 2022). Proces razgradnje ubikvitiniranog proteina započinje tako da receptori Rpn10 i Rpn13 prepoznaju ubikvitinirane supstrate (Slika 3A), a zatim proteasom prebacuje supstrat kroz poru u proteolitičku unutrašnjost (Slika 3B). Translokacija se nastavlja dok ubikvitinski lanac ne dođe u kontakt s podjedinicom Rpn11, što dovodi do deubikvitinacije supstrata (Slika 3C). Posebne HECT

ligaze vezane uz proteasom još jednom ubikvitiniraju supstrat kako bi se promijenila njegova orijentacija i olakšalo daljnje odmatanje i interakcija sa sustavom proteasoma (Slika 3D). Nastavlja se translokacija, a protein se degradira (Slika 3E).



Slika 3: Djelovanje ligaza HECT na specifičnost i procesivnost proteasoma. (A) Na početku procesa receptori Rpn10 i Rpn13 prepoznaju ubikvitinirane supstrate. (B) Nakon toga, proteasom prebacuje supstrat kroz poru u proteolitičku unutrašnjost. (C) Translokacija se nastavlja dok ubikvitinski lanac ne dođe u kontakt s podjedinicom Rpn11, što dovodi do deubikvitinacije supstrata. (D) Posebne HECT ligaze vezane uz proteasom još jednom ubikvitiniraju supstrat kako bi se promijenila njegova orijentacija i olakšalo daljnje odmatanje i interakcija sa sustavom proteasoma. (E) Nastavlja se translokacija, a protein se degradira. Slika je preuzeta iz rada Wang & Spoel, 2022.

Druga klasa ubikvitin ligaza su ligaze RING koje sadrže domenu RING. Najraznovrsnija su skupina E3-ligaza, a samo kod vrste *Arabidopsis thaliana* opisano ih je 469 (Stone et al., 2003). Domenu RING karakteriziraju ponavljajući cisteini i histidini koji se u srži proteina povezuju preko atoma cinka i tako osiguravaju stabilnost (Borden et al., 1995). Domena RING se može povezati s enzimima za konjugaciju E2 istovremeno se povezujući i sa supstratom te tako olakšati ubikvitinaciju. Parovi enzima E2 i E3 nisu stabilni, a afinitet domena RING za enzime E2 je u *in vitro* uvjetima nizak (Xie & Varshavsky, 1999). Domena RING je važna samo za povezivanje ovog tipa E3-ligaza s enzimima za konjugaciju E2, a za vezanje supstrata nije ključna (Stone et al., 2003).

Treća klasa su ligaze U-box. Ligaze ovog tipa su zastupljenije kod biljaka nego kod npr. kvasaca ili ljudi – kod kvasaca ih ima samo dva, kod ljudi 21, a kod riže čak 77, što sugerira da je njihova uloga u biljaka značajnija (Chen & Hellmann, 2013). Motiv nazvan U-box (po kojemu je klasa i dobila ime, sastoji se od oko 70 aminokiselina, što je kraće od domene HECT koja sadrži oko 250

aminokiselina (H. C. Kim et al., 2011). Klasa ligaza s U-kutijom povezana je s poliubikvitinacijom (Ohi et al., 2003).

3. Uloga proteasoma u biljaka

3.1. Uloga proteasoma u odgovoru na stres u biljaka

Biljke se moraju neprestano prilagođavati okolišu u kojem žive. Osim adaptacija koje pojedine vrste trajno imaju zbog uvjeta u kojima žive, biljke se uspješno aklimatiziraju na nagle promjene okolišu. Promjena saliniteta, zračenje, manjak nutrijenata, hladnoća ili suša uzrokuju abiotički stres, napad patogena biotički, a biljka različitim mehanizmima radi na ponovnom uspostavljanju homeostaze. U tom procesu važnu ulogu ima upravo proteom. Najviše se mijenja sastav ligaza E3 zbog njihove nezamjenjive uloge u razgradnji proteina koja se temelji na specifičnom označavanju ciljnoga proteina (Xu & Xue, 2019). Sinteza biljnih hormona također je regulirana proteosomalnom razgradnjom. Hormoni također mogu modificirati djelovanje ligaza E3, olakšavajući povezivanje sa supstratom (Kelley & Estelle, 2012).

3.1.1. Abiotički stres

Odgovor biljaka na sušu jednak je odgovoru na povišen salinitet, jer biljka oba uvjeta zapaža kao osmotski stres. Kod vrste *Arabidopsis thaliana*, transkripcijski faktor DREB2A (engl. DRE-BINDING PROTEIN 2A) pojačava transkripciju mnogih gena induciranih sušom ili povišenim salinitetom vezujući regulatornu sekvencu DRE (engl. *dehydration responsive element*), a u normalnim uvjetima nije eksprimiran (Sakuma et al., 2006). U stresu se induciraju E3-ligaze DRIP1 i DRIP2 čija je uloga obilježavanje transkripcijskog faktora DREB2A za razgradnju (Sakuma et al., 2006). Kod mutanata *drip1* i *drip2*, primjećena je povećana koncentracija proteina specifičnih za uvjete suše (Xu & Xue, 2019). Neke ligaze E3, na primjer AtAIRP3/LOG2, sudjeluju u odgovoru na osmotski stres koji je posredovan apscizinskom kiselinom (ABA) (Kim & Kim, 2013).

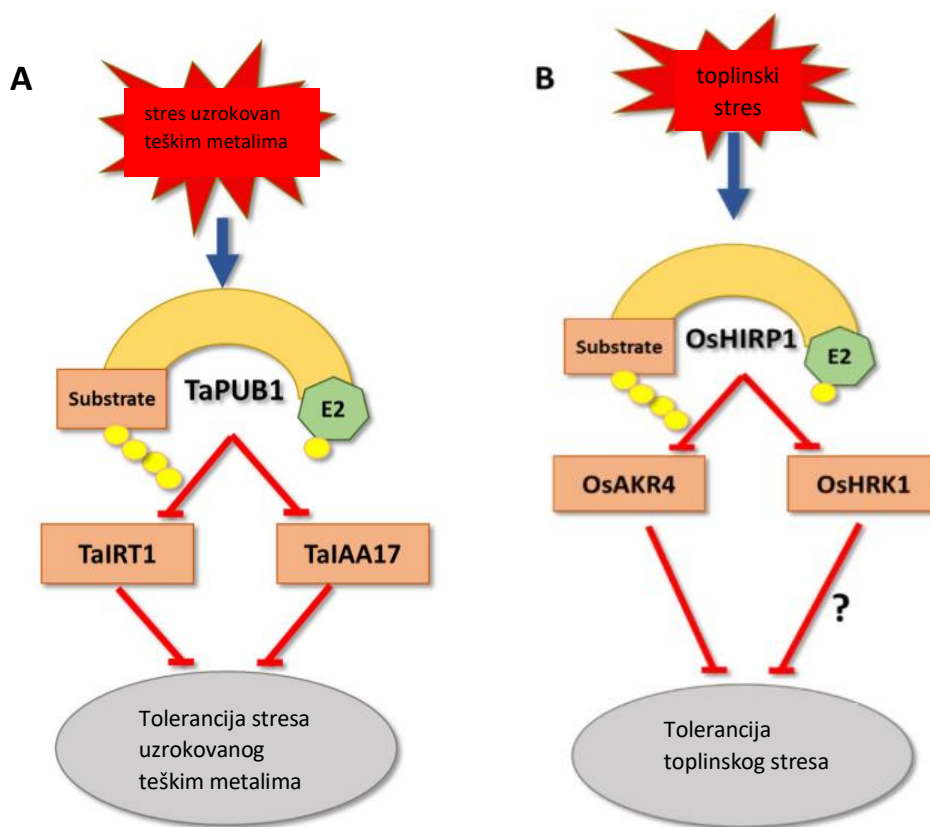
Uzrok stresa kod biljaka je i hladnoća, jer utječe na stabilnost membrana, a ukoliko dođe do smrzavanja, biljka „osjeća“ manjak vode. Kod uročnjaka čak 306 gena značajno mijenja razinu

ekspresije kad je biljka izložena hladnoći (Fowler & Thomashow, 2002). Biljka hladnoću registrira receptorima na membranama, nakon čega se signal provodi dalje i aktivira transkripcijsku kaskadu (Yadav, 2010). Transkripcijsku kaskadu pokreće transkripcijski aktivator ICE1 čime se pojačava ekspresija gena za transkripcijske faktore CBF (engl. *C-repeat/DREB binding factors*). Proteini CBF dalje aktiviraju gene potrebne za odgovor biljke na stres uzrokovan hladnoćom. Ligaza E3 HOS1 (engl. *high expression of osmotically responsive gene 1*) uključena je u ubikvitinaciju i razgradnju transkripcijskog aktivatora ICE1 (engl. *Inducer of CBF expression 1*). Mutant *hos1* ima konstitutivan odgovor na hladnoću, dok overekspresija gena *HOS1* dovodi do povećane osjetljivosti na stres uzrokovan hladnoćom (Dong et al., 2006).

Toplinski stres kod biljaka ima negativan utjecaj a fotosintezu, što usporava rast i razvoj biljke. Ligaza E3 OsHIRP1 (engl. *Oryza sativa heat-induced RING finger protein 1*) kod riže regulira odgovor na toplinski stres. Do pojačane transkripcije gena za E3-ligazu OsHIRP1 dolazi u toplinskom stresu, tj. na temperaturi od 45 °C, a kad se sintetizira odlazi u jezgru i ubikvitinira proteine OsARK4 (engl. *Aldo/keto reductase 4*) i OsHRK1 (engl. *HIRP1-regulated kinase 1*) (Slika 4b) (Al-Saharin et al., 2022). Sjemenke biljaka s overekspresijom gena *OsHIRP1* imaju veću stopu klijavosti u uvjetima povišene temperature u usporedbi s biljkama s normalnom ekspresijom tog gena. Točna uloga proteina koji su supstrati ligaze OsHIRP1 nije poznata, ali jasno je da overekspresija gena *OsHIRP1* i njihova razgradnja povećavaju transkripciju gena za odgovor na toplinski stres, kao na primjer *HSP20* (J. H. Kim et al., 2019).

Abiotički stres u biljaka može biti uzrokovan i teškim metalima. Teški metali imaju nepovoljan utjecaj na proteine jer mogu poremetiti ravnotežu metalnih iona koji enzimima služe kao kofaktori ili narušiti ravnotežu disulfidnih veza. Nadalje, teški metali u biljnim stanicama dovode do stvaranja reaktivnih kisikovih oblika koji mogu oštetiti stanične komponente (Al-Saharin et al., 2022). Do sada je poznato više ligaza E3 koje sudjeluju u odgovoru biljke na stres uzrokovan teškim metalima. Jedan od pozitivnih regulatora odgovora na teške metale je kod riže ligaza E3 OsHIR1 (engl. *Heavy metal induced RING E3 ligase 1*). Ligaza OsHIR1 ubikvitinira i usmjerava u razgradnju protein OsTIP4;1 (engl. *Tonoplast intrinsic protein 4;1*). Protein OsTIP4;1 stanici služi za transport vode i glicerola, no ukoliko arsen uđe u biljku, može „preuzeti“ transportere. Zbog toga razgradnja proteina OsTIP4;1 dovodi do smanjenog unosa arsena i boljeg preživljavanja. Očekivano, pokazano je da su biljke s overekspresijom gena *OsHIR1* manje su osjetljive na tretman

arsenom (Lim et al., 2014). Druga ligaza E3 koja omogućuje biljci toleranciju stresa uzrokovanog teškim metalima je U-box ligaza TaPUB1 (engl. *Triticum aestivum* Plant U-box 1) identificirana kod pšenice, a ima ulogu u toleranciji kadmija. Ligaza TaPUB1 posreduje u razgradnji proteina TaIRT1 (engl. iron-regulated transporter 1) koji je transporter željeza, ali u stanicu može prenositi i kadmij. Također, razgradnja proteina TaIAA17 (engl. *indole-3-acetic acid inducible 17*) posredovana je ligazom TaPUB1. Protein TaIAA17 je represor gena ovisnih o auksinu te negativni regulator produžnog rasta korijena (Han et al., 2014) (Slika 4a). Ulaskom kadmija u biljku, pada razina auksina, što dovodi do smanjene razgradnje TaIAA17 posredovane auksinom i smanjene ekspresije gena koji su pod utjecajem auksina. Uloga ligaze TaPUB1 je kompenzirati sniženu razinu auksina zbog suviška kadmija, tako što potiče razgradnju TaIAA7. Zbog ovog mehanizma biljka uspijeva održati normalan produžni rast korijena (G. Zhang et al., 2021).



Slika 4: Shematski prikaz tolerancije stresa posredovane ligazama E3, odnosno sustavom proteasomalne razgradnje. (A) Pri stresu uzrokovanom teškim metalima kod pšenice ligaza E3 TaPUB1 ubikvitinira TaIRT1 i TaIAA17, čija razgradnja omogućuje biljci toleranciju ove vrste stresa. (B) Kod riže pri toplinskom stresu se aktivira ligaza E3 OsHIRP1 koja ubikvitinira OsAKR4 i OsHRK1, što omogućava toleranciju toplinskog stresa. Slika je preuzeta iz rada Al-Saharin et al. (2022).

3.1.2. Biotički stres

Biotički stres kod biljaka izazvan je napadom patogena, a najčešće se radi o gljivicama, kukcima, bakterijama i virusima. Odgovor na napad patogena je pod kontrolom hormona. Pri napadu patogena induciraju se hormoni salicilna kiselina (SA) i jasmonska kiselina (JA). Odgovor aktiviran salicilnom kiselinom karakterističan je za napad biotrofnih patogena, koji napadaju živa tkiva, dok je odgovor potaknut jasmonskom kiselinom svojstven nekrotrofnim patogenima (Spoel et al., 2007). Transkripcijski faktori MYC najvažniji su posrednici u odgovoru biljaka na patogene koji je reguliran JA. Dok nije prisutan aktivan oblik jasmonske kiseline, jasmonoil-izoleucin (JA-Ile), JAZ transkripcijski represori (engl. *jasmonate ZIM-domain*) reprimiraju MYC transkripcijske faktore (F. Zhang et al., 2015). Kompleks Skp–Cullin–F-box, koji je ligaza E3, sadrži receptor COI1 za koji se veže JA-Ile. Vezanjem JA-Ile za receptor COI1 dolazi do proteasomalne razgradnje JAZ represora, što aktivira transkripcijski faktor MYC2 koji utječe na transkripciju velikog broja gena za obranu od patogena (An et al., 2017). Mutant vrste *A. thaliana coil* vrlo je osjetljiv na napad patogena jer ne eksprimira gene koji se inače induciraju pri odgovoru na napad (Xu & Xue, 2019)

Proteasomalna razgradnja također ima vrlo neposrednu ulogu u odgovoru na napad virusa. Djelovi virusnih čestica mogu biti meta proteasomalne razgradnje, što štiti biljku od napada virusa ili barem ublažava simptome infekcije. Kod vrste *Nicotiana tabacum* dva su enzima za aktivaciju ubikvitina (E1), enzimi NtUBA1 i NtUBA2 (engl. *Nicotiana tabacum* ubiquitin activating enzyme), uključena u odgovor na infekciju virusom mozaika duhana (TMV) i virusom mozaika rajčice (ToMV) (Dubiella & Serrano, 2021). Nije poznato koje proteine virusa enzimi ubikvitiniraju i razgrađuju, no primijećena je povećana ekspresija proteina NtUBA1 i NtUBA2 pri infekciji. Cilj ubikvitinacije mogu biti proteini kapside ili proteini koji virusu služe za pokretanje (engl. *movement proteins*), čime se sprječava pakiranje virusnih čestica i njihovo širenje kroz biljku. Meta ubikvitinacije su proteini ključni za replikaciju virusa, pri čemu nije nužno da dođe do razgradnje. Ubikvitinacija može onemogućiti interakcije proteina domaćina i virusa koje su nužne za replikaciju. Moguća je i selektivna razgradnja samo nekih podjedinica replikacijskog kompleksa, tako da dolazi do neravnoteže među komponentama, a sklapanje funkcionalnog kompleksa nije moguće (Alcaide-Loridan & Jupin, 2012). Na primjer, replikaciju +ssRNA virusa obavlja RNA-ovisna RNA-polimeraza koja je meta proteasomalne razgradnje, što je pokazano kod virusa žutog mozaika

postrne repe u stanicama uročnjaka (Camborde et al., 2010). Osim proteina, proteasom može razgraditi i virusnu RNA, što je pokazano kod virusa mozaika duhana. Postoji i mehanizam ublažavanja simptoma infekcije, koji nema utjecaj na replikaciju. Na primjer, kad se u stanici u povećanoj količini nalazi NtRFP1 (engl. *Nicotiana tabacum* RING-finger protein), simptomi virusne infekcije su slabiji. (Dubiella & Serrano, 2021).

3.2. Uloga proteasomalne razgradnje u razvoju kloroplasta

Kloroplasti su fotosintetski plastidi u biljaka. Zbog toga što su nastali endosimbiozom, kloroplasti imaju vlastitu DNA kojom kodiraju dio proteina potrebnih za njihovu funkciju (Thomson et al., 2020). Unatoč tome, velik dio genoma primarnog endosimbionta se izgubio ili preselio u jezgru, tako da danas kloroplasti kodiraju svega stotinjak proteina (Leister, 2003). Preostalih 2000 do 3000 proteina je kodirano jezgrinim genomom, te se posttranslacijski prenose u kloroplaste (Sjuts et al., 2017). Neki od tih proteina imaju važnu ulogu u razvoju kloroplasta. Unos proteina u kloroplaste ključan je za njihov razvoj i konverziju jednog tipa plastida u drugi, jer upravo proteom utječe na razvojni put plastida (Lopez-Juez & Pyke, 2005).

Proteini se u kloroplaste unose putem kompleksa TOC koji se nalazi na vanjskoj ovojnici (engl. *translocon on the outer chloroplast membrane*) i TIC koji se nalazi na unutarnjoj ovojnici (engl. *translocon on the inner chloroplast membrane*). Izbor proteina koji će se unijeti u kloroplast odvija se na kompleksu TOC koji ima specifične receptore, što pridonosi kontroli proteoma kloroplasta, razvojnog puta i funkcija. Kod vrste *A. thaliana* značajnu ulogu u unosu proteina u kloroplaste ima E3-ligaza Sp1 koja se nalazi u vanjskoj membrani, uz TOC kompleks. Njena uloga je ubikvitiniranje podjedinica TOC kompleksa, što rezultira njihovom razgradnjom (Ling et al., 2012). Ligaza Sp1 pripada skupini RING E3 ligaza, a RING domenom se može povezivati s konjugacijskim enzimom E2. Ovisno o funkcionalnosti RING domene, protein Sp1 može sam sebe mono- ili poliubikvitinirati, što pokazuje da postoji određena razina autoregulacije. Protein Sp1 svakako ima ulogu u reorganizaciji kompleksa TOC (Ling et al., 2019).

Važnost proteasomalnog sustava u razvoju kloroplasta očituje se još u periodu prije klijanja. Klijanje je pod utjecajem hormona giberelina. Kad je koncentracija giberelina niska, DELLA proteini sprječavaju klijanje, a utječu i na smanjenje koncentracije proteina Toc159. Receptor

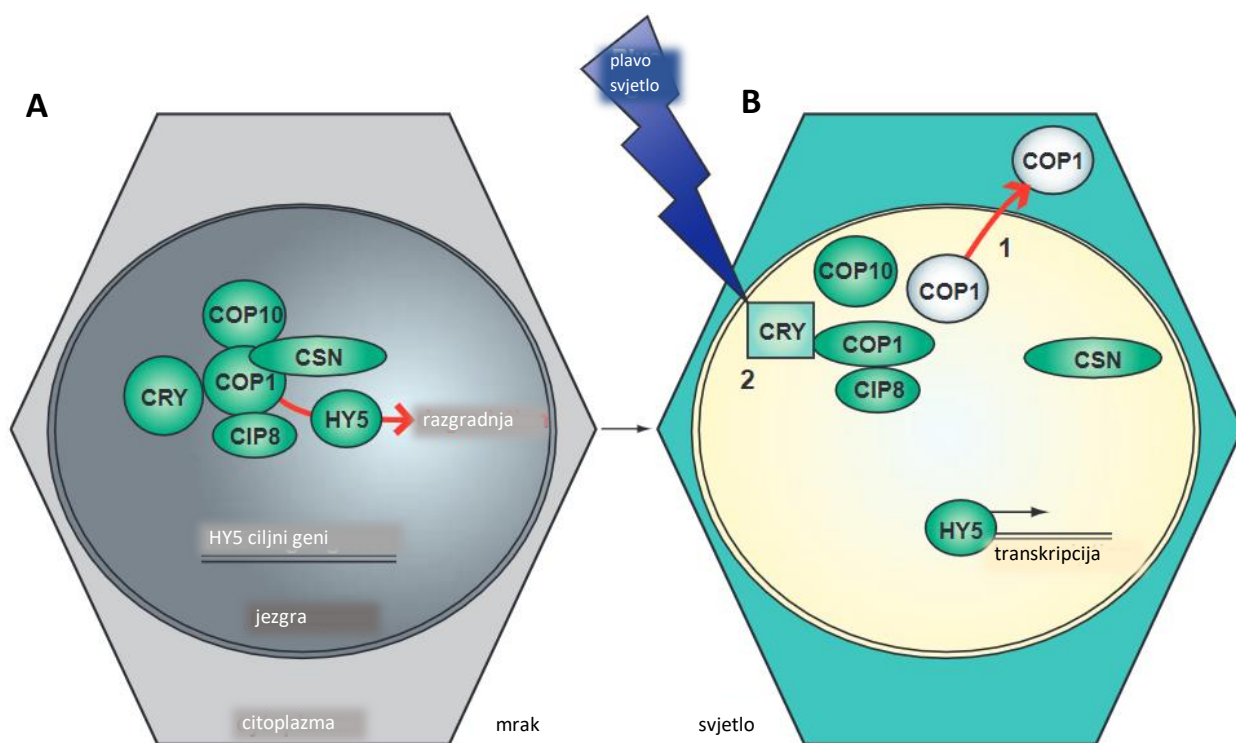
Toc159, koji je dio kompleksa TOC, ima ključnu ulogu u prepoznavanju proteina koji se unose u kloroplaste. Giberelini u povišenoj koncentraciji pomažu razgradnju DELLA proteina i tako induciraju klijanje te nastanak kloroplasta. Pri niskoj koncentraciji giberelina, DELLA proteini mogu interagirati s podjedinicom Toc159 i inducirati njenu proteasomalnu razgradnju prije nego što postane dio TOC kompleksa te tako spriječiti razvoj kloroplasta. Očekivano, u mutanata *toc159* kloroplasti se ne razvijaju, a biljke imaju albino fenotip (Shanmugabalaji et al., 2018).

3.3. Regulacija razvoja ovisnog o svjetlu

Sustav proteasomalne razgradnje ima važnu funkciju u regulaciji ekspresije gena koji su pod utjecajem svjetla. Ligaza E3 iz klase RING, protein Cop1, omogućava represiju transkripcije gena ovisnih o svjetlu kod biljaka koje rastu u mraku (Hellmann & Estelle, 2002). U uročnjaka je indentificirano više linija mutanata *cop1* koje rastu u mraku, a imaju fenotip klijanaca specifičan za rast na svjetlu. Fenotipske osobine uključuju formiran fotosintetski aparat, razvijene listove, povećane kotiledone s diferenciranim stanicama i akumuliran antocijan. Ukoliko se duže ostave u mraku, početak će razvijati i prave listove (Deng & Quail, 1992).

Aktivnost E3 ligaze Cop1 regulirana je svjetlom (Slika 5). Kod biljaka koje rastu u mraku, Cop1 je u interakciji s proteinima Cop10, CSN i CRY te s transkripcijskim faktorom HY5. Kompleks Cop10 vjerojatno ima ulogu enzima za konjugaciju E2, za što je često potrebna interakcija s nekom drugom ligazom E2, zbog nefunkcionalnog cisteina. Protein CRY apsorbira plavu svjetlost (Hellmann & Estelle, 2002), i to po principu redoks reakcije ovisne o svjetlu (Cashmore et al., 1999). Dok je biljka u mraku, transkripcijski faktor HY5 stupa u interakciju s E3-ligazom Cop1, zbog čega odlazi proteasomalnu razgradnju. Zbog toga ne dolazi do transkripcije gena pod utjecajem HY5, odnosno gena koji se eksprimiraju na svjetlu. Kad je biljka izložena svjetlosti, svjetlo potiče translokaciju Cop1 u citoplazmu te interakciju Cop1 s CRY zbog čega ne dolazi do proteasomalne razgradnje HY5, a prepisuju se geni ovisni o svjetlu (Hellmann & Estelle, 2002). Iako se interakcija CRY-Cop1 odvija i u mraku i na svjetlu te utječe na aktivnost proteina Cop1, ona ne dovodi do potpune inaktivacije Cop1. CRY se za Cop1 veže preko svoje C-terminalne domene, čija overekspresija dovodi do neaktivnosti Cop1 proteina, što rezultira stabilnošću HY5 (Yang et al., 2001).

Razgradnju proteina HY5 može potaknuti i ligaza E3 CIP8 djelujući kao heterodimer s ligazom Cop1. Nadalje, Cop1 ne ubikvitinira samo transkripcijski aktivator HY5, već i koaktivatore CIP4 i CIP7 koji su također odgovorni za razvoj ovisan o svjetlu, no direktan učinak proteasomalne razgradnje na razine ovih proteina u stanici nije razjašnjen (Holm & Deng, 1999). Ekspresija gena ovisnih o svjetlu može biti potaknuta i drugim transkripcijskim faktorima, osim HY5. Kod mutanata *hy5* je pokazano da overekspresija HYH može suprimirati učinke mutacije, što znači da proteini HY5 i HYH imaju sličnu funkciju (Holm et al., 2002).



Slika 5: (A) Kod biljaka koje rastu u mraku, E3-ligaza Cop1 je u interakciji s proteinima Cop10, CSN, CIP8 i CRY te s transkripcijskim faktorom HY5. Interakcija HY5 s E3-ligazom Cop1, vodi HY5 u proteasomalnu razgradnju. Zbog toga ne dolazi do transkripcije gena koji su regulirani transkripcijskim faktorom HY5. (B) Kod biljaka koje rastu na svjetlu, protein CRY apsorbira plavu svjetlost. Svjetlo potiče translokaciju Cop1 u citoplazmu (1) te interakciju Cop1 s CRY što utječe na njegovu funkciju (2). Slika je preuzeta iz rada Hellmann & Estelle (2002).

4. Zaključak

Proteasomalna razgradnja iznimno je važan proces za sve organizme, pa tako i za biljke. Kompleksnost ovog sustava, specifičnost, kao i složena regulacija, ukazuju na njegovu nezamjenjivost u obrtu proteina u biljkama koja ima utjecaja na sve stanične procese. Kompleks proteasoma sa svojom središnjom i regulatornim podjedinicama, kao i ligaze koje provode ubikvitinaciju i doprinose specifičnosti razgradnje, odgovorni su za 80 – 90% razgrađenih proteina u stanici. Ligaze E3 svojom raznolikošću i specifičnosti prema ciljnom proteinu reguliraju odvijanje brojnih metaboličkih i razvojnih procesa. Proteasomalna razgradnja određenih transkripcijskih faktora omogućuje ekspresiju gena potrebnih za odgovor biljke na stresne uvjete, kao što su hladnoća, toplina, utjecaj teških metala ili suša. Nadalje, biljke obranu od virusa mogu ostvariti direktnom proteasomalom razgradnjom virusnih proteina ili samo njihovom ubikvitinacijom. Razvoj biljaka je u značajnoj mjeri ovisan o svjetlu, što je također regulirano proteasomalnom razgradnjom. U kloroplastima proteasomalna razgradnja regulira unos proteina reorganizirajući kompleks translokona na vanjskoj membrani, što omogućava sazrijevanje kloroplasta. Iako eksperimenti pokazuju da overekspresija određenih ligaza E3 dovodi do poboljšane tolerancije na određeni stresni uvjet, točne mehanizme za neke od njih potrebno je tek istražiti, kao i supstrate brojnih ligaza E3 koji trenutno nisu poznati.

5. Literatura

- Alcaide-Loridan, C., & Jupin, I. (2012). Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiology*, *160*(1), 72–82. <https://doi.org/10.1104/pp.112.201905>
- Al-Saharin, R., Hellmann, H., & Mooney, S. (2022). Plant E3 Ligases and Their Role in Abiotic Stress Response. In *Cells* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11050890>
- An, C., Li, L., Zhai, Q., You, Y., Deng, L., Wu, F., Chen, R., Jiang, H., Wang, H., Chen, Q., & Li, C. (2017). Mediator subunit MED25 links the jasmonate receptor to transcriptionally active chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(42), E8930–E8939. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710885114>
- Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., & Martin, A. (2018). *Structure and Function of the 26S Proteasome*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>
- Borden, K. L. B., Boddy, M. N., Lally, J., O'Reilly, N. J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., & Freemont, P. S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *EMBO Journal*, *14*(7), 1532–1541. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07139.x>
- Callis, J. (2014). The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *The Arabidopsis Book*, *12*, e0174. <https://doi.org/10.1199/tab.0174>
- Camborde, L., Jupin, I., Planchais, S., Tournier, V., Jakubiec, A., Drugeon, G., Lacassagne, E., Pflieger, S., Chenon, M., & Jupin, I. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase during viral infection. *Plant Cell*, *22*(9), 3142–3152. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072090>
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., & Liu, D. (1999). Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. In *Science* (Vol. 284, Issue 5415, pp. 760–765). <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.760>
- Chen, L., & Hellmann, H. (2013). Plant E3 ligases: Flexible enzymes in a sessile world. In *Molecular Plant* (Vol. 6, Issue 5, pp. 1388–1404). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/mp/sst005>
- Demir, F., Niedermaier, S., Villamor, J. G., & Huesgen, P. F. (2018). Quantitative proteomics in plant protease substrate identification. *New Phytologist*, *218*(3), 936–943. <https://doi.org/10.1111/nph.14587>
- Deng, X. -W., & Quail, P. H. (1992). Genetic and phenotypic characterization of cop1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *2*(1), 83–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00083.x>

- D'Ippólito, S., Rey-Burusco, M. F., Feingold, S. E., & Guevara, M. G. (2021). Role of proteases in the response of plants to drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 168, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.09.038>
- Dong, C.-H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., & Zhu, J.-K. (2006). *The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602874103
- Downes, B. P., Stupar, R. M., Gingerich, D. J., & Vierstra, R. D. (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant Journal*, 35(6), 729–742. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01844.x>
- Dubiella, U., & Serrano, I. (2021). The ubiquitin proteasome system as a double agent in plant-virus interactions. In *Plants* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10050928>
- Erales, J., & Coffino, P. (2014). Ubiquitin-independent proteasomal degradation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1843, Issue 1, pp. 216–221). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.008>
- Fowler, S., & Thomashow, M. F. (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 14(8), 1675–1690. <https://doi.org/10.1105/tpc.003483>
- Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin D M, Huber R, Glickman M H, & Finley D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*.
- Han, M., Park, Y., Kim, I., Kim, E. H., Yu, T. K., Rhee, S., & Suh, J. Y. (2014). Structural basis for the auxin-induced transcriptional regulation by Aux/IAA17. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(52), 18613–18618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419525112>
- Hellmann, H., & Estelle, M. (2002). Plant Development: Regulation by Protein Degradation. *Science*, 297, 793–797. <https://doi.org/10.1126/science.1072831>
- Hirano, H., Kimura, Y., & Kimura, A. (2016). Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. In *Journal of Proteomics* (Vol. 134, pp. 37–46). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.016>
- Holm, M., & Deng, X. W. (1999). Structural organization and interactions of COP1, a light-regulated developmental switch. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 41).
- Holm, M., Ma, L. G., Qu, L. J., & Deng, X. W. (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes and Development*, 16(10), 1247–1259. <https://doi.org/10.1101/gad.969702>

- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(7), 2563. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.7.2563>
- Jung, T., Catalgol, B., & Grune, T. (2009). The proteasomal system. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 30, Issue 4, pp. 191–296). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001>
- Kim, H. C., Steffen, A. M., Oldham, M. L., Chen, J., & Huibregtse, J. M. (2011). Structure and function of a HECT domain ubiquitin-binding site. *EMBO Reports*, *12*(4), 334–341. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.23>
- Kim, J. H., & Kim, W. T. (2013). The Arabidopsis RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP3/LOG2 participates in positive regulation of high-salt and drought stress responses. *Plant Physiology*, *162*(3), 1733–1749. <https://doi.org/10.1104/PP.113.220103>
- Kim, J. H., Lim, S. D., & Jang, C. S. (2019). *Oryza sativa* heat-induced RING finger protein 1 (OsHIRP1) positively regulates plant response to heat stress. *Plant Molecular Biology*, *99*(6), 545–559. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00835-9>
- Komander, D., & Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>
- Kurepa, J., & Smalle, J. A. (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*, *90*(2), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.019>
- Leister, D. (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics : TIG*, *19*(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00003-3)
- Lim, S. D., Hwang, J. G., Han, A. R., Park, Y. C., Lee, C., Ok, Y. S., & Jang, C. S. (2014). Positive regulation of rice RING E3 ligase OsHIR1 in arsenic and cadmium uptakes. *Plant Molecular Biology*, *85*(4–5), 365–379. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0190-0>
- Ling, Q., Broad, W., Trösch, R., Töpel, M., Sert, T. D., Lympelopoulou, P., Baldwin, A., & Jarvis, R. P. (2019). Ubiquitin-dependent chloroplast-associated protein degradation in plants. *Science*, *363*(6429). <https://doi.org/10.1126/science.aav4467>
- Ling, Q., Huang, W., Baldwin, A., & Jarvis, P. (2012). Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science*, *338*(6107), 655–659. <https://doi.org/10.1126/science.1225053>
- Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., & Ciechanover, A. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: From birth, through regulation and function, and onto its death. In *Cell Research* (Vol. 26, Issue 8, pp. 869–885). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.86>

- Lopez-Juez, E., & Pyke, K. A. (2005). Plastids unleashed: Their development and their integration in plant development. In *International Journal of Developmental Biology* (Vol. 49, Issues 5–6, pp. 557–577). <https://doi.org/10.1387/ijdb.051997el>
- Ma, M., & Liu, Z. L. (2010). Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover YAP1, PDR1, PDR3, RPN4, and HSF1 as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-660>
- Macrae, R. K., & Long, J. A. (2012). Transcriptional Regulation in Plants. In *eLS*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0023755>
- Majumder, P., Rudack, T., Beck, F., Danev, R., Pfeifer, G., Nagy, I., & Baumeister, W. (2019). Cryo-EM structures of the archaeal PAN-proteasome reveal an around-the-ring ATPase cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(2), 534–539. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817752116>
- Malloy, M. T., McIntosh, D. J., Walters, T. S., Flores, A., Goodwin, J. S., & Arinze, I. J. (2013). Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: Implications for degradation of nrf2 in the nucleus. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 288, Issue 20, pp. 14569–14583). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.437392>
- Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., & Feldmann, H. (1999). Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Letters*, *450*(1–2), 27–34. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00467-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00467-6)
- Murata, S., Yashiroda, H., & Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 2, pp. 104–115). <https://doi.org/10.1038/nrm2630>
- Nelson, C. J., & Millar, A. H. (2015). Protein turnover in plant biology. In *Nature Plants* (Vol. 1). Palgrave Macmillan Ltd. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.17>
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., & Pickett, C. B. (2003). Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated by the Antioxidant Response Element. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 43, pp. 233–260). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229>
- Ohi, M. D., Vander Kooi, C. W., Rosenberg, J. A., Chazin, W. J., & Gould, K. L. (2003). Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nature Structural Biology*, *10*(4), 250–255. <https://doi.org/10.1038/nsb906>
- Pickering, A. M., Staab, T. A., Tower, J., Sieburth, D., & Davies, K. J. A. (2013). A conserved role for the 20S proteasome and Nrf2 transcription factor in oxidative stress adaptation in

- mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(4), 543–553. <https://doi.org/10.1242/jeb.074757>
- Radhakrishnan, S. K., Lee, C. S., Young, P., Beskow, A., Chan, J. Y., & Deshaies, R. J. (2010). Transcription Factor Nrf1 Mediates the Proteasome Recovery Pathway after Proteasome Inhibition in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 38(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.029>
- Sakata, E., Bohn, S., Mihalache, O., Kiss, P., Beck, F., Nagy, I., Nickell, S., Tanaka, K., Saeki, Y., Förster, F., & Baumeister, W. (2012). Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), 1479–1484. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1119394109/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605639103
- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. In *Planta* (Vol. 220, Issue 2, pp. 183–197). <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1407-2>
- Shanmugabalaji, V., Chahtane, H., Accossato, S., Rahire, M., Gouzerh, G., Lopez-Molina, L., & Kessler, F. (2018). Chloroplast Biogenesis Controlled by DELLA-TOC159 Interaction in Early Plant Development. *Current Biology*, 28(16), 2616-2623.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.006>
- Sjuts, I., Soll, J., & Bölder, B. (2017). Import of soluble proteins into chloroplasts and potential regulatory mechanisms. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8, Issue FEBRUARY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00168>
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., & Dong, X. (2007). *Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Stone, S. L., Anderson, E. M., Mullen, R. T., & Goring, D. R. (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen. *Plant Cell*, 15(4), 885–898. <https://doi.org/10.1105/tpc.009845>
- Tanaka, K. (2009). *The proteasome: Overview of structure and functions*. <https://doi.org/10.2183/pjab/85.12>
- Thomson, S. M., Pulido, P., & Jarvis, R. P. (2020). Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 48, Issue 1, pp. 71–82). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20190274>

- Van Der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59, pp. 191–223).
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>
- Van Der Hoorn, R. A. L., & Jones, J. D. G. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 7, Issue 4, pp. 400–407).
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.003>
- Vierstra, R. D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 385–397).
<https://doi.org/10.1038/nrm2688>
- Wang, Z., & Spoel, S. H. (2022). HECT ubiquitin ligases as accessory proteins of the plant proteasome. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 66, Issue 2, pp. 135–145). Portland Press Ltd.
<https://doi.org/10.1042/EBC20210064>
- Xie, Y., & Varshavsky, A. (1999). The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: The RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *EMBO Journal*, 18(23), 6832–6844. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.23.6832>
- Xie, Y., & Varshavsky, A. (2001). *RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: A negative feedback circuit.*
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.071022298
- Xu, F. Q., & Xue, H. W. (2019). The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. In *Plant Cell and Environment* (Vol. 42, Issue 10, pp. 2931–2944). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/pce.13633>
- Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. In *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 30, Issue 3, pp. 515–527).
<https://doi.org/10.1051/agro/2009050>
- Yanagawa, Y., Hasezawa, S., Kumagai, F., Oka, M., Fujimuro, M., Naito, T., Makino, T., Yokosawa, H., Tanaka, K., Komamine, A., Hashimoto, J., Sato, T., & Nakagawa, H. (2002). Cell-Cycle Dependent Dynamic Change of 26S Proteasome Distribution in Tobacco BY-2 Cells. In *Plant Cell Physiol* (Vol. 43, Issue 6).
- Yang, H.-Q., Tang, R.-H., & Cashmore, A. R. (2001). The Signaling Mechanism of Arabidopsis CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *The Plant Cell*, 13(12), 2573–2587.
<https://doi.org/10.1105/tpc.010367>
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C. M., Smalle, J., Ju, Y. M., & Vierstra, R. D. (2004). Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: Biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6401–6413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311977200>

- Yoshimoto, K. (2012). Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. In *Plant and Cell Physiology* (Vol. 53, Issue 8, pp. 1355–1365). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs099>
- Zhang, F., Yao, J., Ke, J., Zhang, L., Lam, V. Q., Xin, X. F., Zhou, X. E., Chen, J., Brunzelle, J., Griffin, P. R., Zhou, M., Xu, H. E., Melcher, K., & He, S. Y. (2015). Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nature*, *525*(7568), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature14661>
- Zhang, G., Yang, J., Zhang, M., Li, Q., Wu, Y., Zhao, X., Zhang, H., Wang, Y., Wu, J., & Wang, W. (2021). Wheat TaPUB1 Regulates Cd Uptake and Tolerance by Promoting the Degradation of TaIRT1 and TaIAA17. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(21), 5818–5829. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c08042>
- Zong, N., Ping, P., Lau, E., Choi, H. J. H., Ng, D. C. M., Meyer, D., Fang, C., Li, H., Wang, D., Zelaya, I. M., Yates, J. R., & Lam, M. P. Y. (2014). Lysine ubiquitination and acetylation of human cardiac 20S proteasomes. *Proteomics - Clinical Applications*, *8*(7–8), 590–594. <https://doi.org/10.1002/prca.201400029>

6. Životopis

Andrea Belamarić rođena je 10.6.2001. u Zagrebu gdje je završila XV gimnaziju. Nakon toga upisuje studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Aktivna je članica studentske udruge Istraživački centar mladih gdje vodi pripreme učenika srednjih škola za međunarodno eksperimentalno natjecanje *International Young Naturalists' Tournament*. Autorica je prijevoda proze i poezije sa švedskog jezika na hrvatski, od kojih su neki i objavljeni u časopisu *Poezija*. Uz studij pohađa i srednju glazbenu školu Blagoja Berse, smjer solo-pjevanje.