

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Ruth Tachezy

Glutamátové receptory a kvalitativní kontrola v endoplasmatickém retikulu

Glutamate Receptors and Endoplasmatic Reticulum Quality Control

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Martin Horák, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

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

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Martin Horákovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za pomoc s její přípravou. Taktéž patří mé poděkování prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D a RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D za odborné konzultace a jazykovou korekturu.

Dále bych chtěla poděkovat přátelům a blízkým za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Kvalitativní kontrola (QC) je soubor procesů, které se účastní biogeneze a výstavby proteinů. Cílem této práce je tyto procesy detailně popsat. V buňce probíhá QC na mnoha úrovních. Popisují QC endoplazmatického retikula (ER) a s ní propojenou QC cytosolickou. QCER zahrnuje více druhů translokace do lumen ER, glykosylaci, formování disulfidických můstků pomocí protein disulfid izomerázy (PDI), chaperony účastníci se těchto procesů a ER-asociovanou degradační dráhu, která chybně sbalené proteiny retranslokuje zpět do cytoplasmy, kde jsou následně degradovány v proteosomu. QC cytosolu je s ERQC propojená, neboť proteiny se translatují v cytosolu a jsou poté různými druhy drah přenášeny na nebo přes membránu ER. S cytosolickou degradací proteinů v proteosomu souvisí ubiquitinace proteinů a účastní se jí také cytosolické chaperony a další buněčné organely, jako například agresomy, juxtannukleární kompartmenty a depozita nerozpustných proteinů. S kvalitativní kontrolou a správným sbalením proteinů v ER je rovněž spojena vápníková rovnováha. Například chybné sbalení glutamátových receptorů vede k některým neurodegenerativním onemocněním.

Klíčová slova: kvalitativní kontrola, endoplasmatické retikulum, ERAD, ERQC, glutamátový receptor, protein, glykosylace, posttranslační modifikace, degradace, proteosom, ubiquitinace

Abstract

Quality control (QC) is a collection of processes taking part in the biogenesis and architecture of proteins. The objective of this thesis is to describe these processes in detail. QC takes place on many different levels in various compartments of the cell. The focus is on the endoplasmic reticulum (ER) QC interconnected with cytosolic QC. There are multiple steps involved in ERQC: several types of protein translocation to the ER lumen, glycosylation, disulfide bond formation via protein disulfide isomerase, chaperones that assist to achieve a correct conformation, and ER-associated degradation pathway for retranslocation of misfolded proteins back to the cytoplasm, where they are degraded. Cytosolic QC is interconnected with the ERQC through various ways of translocation of proteins to the ER membrane or lumen. Proteins that are retranslocated from ER to the cytosol are ubiquitinated and subsequently degraded in the proteasome. Ubiquitination is a process of targeting a protein for degradation. Cytosolic chaperones and other cellular structures, such as aggresomes, juxtannuclear compartments, and insoluble protein deposits, take part in the ubiquitination. Calcium dysregulation that is linked to QC and correct protein folding in ER is also described. Some of the possible consequences of protein misfolding are pointed out. For instance, the misfolding of glutamate receptors leads to neurodegenerative diseases.

Key words: quality control, endoplasmic reticulum, ERAD, ERQC, glutamate receptor, protein, glycosylation, posttranslational modification, degradation, proteasome, ubiquitination

Seznam použitých zkratek

AA	aminokyselina	amino acid
AD	Alzheimerova choroba	Alzheimer's disease
ADP	adenosindifosfát	adenosine diphosphate
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATD	amino (N)-terminální doména	amino (N)- terminal domain
ATF	aktivační transkripční faktor	activating transcription factor
ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
A β	amyloid β	amyloid β
Bag6	protein kódovaný BC-2 asociovaným anthanogenem 6	protein encoded by BC-2-associated anthanogene 6
Bip	protein vázající imunoglobulin	immunoglobulin binding protein
C/EBP	transkript 3 indukovatelný poškozením	DNA damage-inducible transcript 3
CNS	centrální nervová soustava	central nervous system
CNX	calnexin	calnexin
CRT	kalretikulin	calreticulin
CTD	karboxyl (C)-terminální doména	carboxyl (C) - terminal domain
CXXC	CysXXCys	CysXXCys
EDEM	ER degradace zvyšující alfa-manosidázu - podobného proteinu	ER degradation enhancing alpha mannosidase-like protein
eIF2	iniciační faktor 2	initiation factor 2
ER	endoplasmatické retikulum	endoplasmatické retikulum
ERAD	ER - asociovaná degradační dráha	ER-associated degradation pathway
Ero1	oxidoreduktin 1	oxidoreductin 1
ERQC	ER - kvalitativní kontrola	ER Quality Control
FAD	flavinadenindinukleotid	flavinadenindinucleotid

FKBP	FK506 – vázající proteiny	FK506 – binding proteins
GA	Golgiho aparát	Golgi apparatus
GADD 34	protein indukovatelný poškozením DNA	DNA damage inducible protein
GET	dráha navádění vstupu TA proteinů	guided Entry of Tail-anchor
Glc3Man9GlcNAc2	Glukóza3 Manóza 9 N-acetylglukosamin 2	Glucose3 Mannose9 N-acetylglucosamine 2
GlcNAc	N-acetylglukosamin	N-acetylglucosamin
GPx	glutation peroxidáza	glutathion peroxidase
GSH	glutation	glutathione
GSSG	glutation disulfid	glutathione disulfide
HD	Huntingtonova choroba	Huntington's disease
HMGR	3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A reduktáza	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A reductase
Hrd	HMG-CoA reduktázový degradační protein	HMG-CoA reductase degradation protein
Hsp	proteiny teplotního šoku	heat shock proteins
iGluRs	ionotropní glutamátové receptory	ionotropic glutamate receptors
IPOD	depozita nerozpustných proteinů	insoluble proteins deposits
IRE1	inositol-vyžadující enzym	inositol-requiring enzyme-1
JUNQ	juxt nukleární kompartment kontroly kvality	Juxt nuclear quality control compartment
LBD	doména vázající ligand	ligand binding domain
mGluRs	metabotropní glutamátové receptory	metabotropic glutamate receptors
MHC I	hlavní histokompatibilní komplex	major histocompatibility complex
MTOC	mikrotubulární organizační centrum	mikrotubule organisation centrum
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát	nicotinamide adenine dinucleotide
NMDA	N-methyl-D-aspartát	N-Methyl-D-aspartic acid
OST	oligosacharyl transferáza	oligosaccharyltransferase

PD	Parkinsonova choroba	Parkinson's disease
PERK	RNA-aktivovaná proteinkináza-podobná ER kináze	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum protein kinase
PexIV	peroxidredoxin	peroxidredoxin
PPIase	peptidyl-prolyl izomeráza	peptidyl-prolyl isomerase
PpaF	kvasinkový párovací faktor alfa	yeast mating factor alpha
PQC	proteinová kvalitativní kontrola	protein quality control
QC	kvalitativní kontrola	quality control
SCAP	Sterol regulační element-vázající protein štěpící aktivační protein	Sterol regulatory element-binding cleavage activating protein
SEL1	Supresor proteinu podobného proteinu typu 1 lin-12	Suppressor of lin-12-like protein 1
Sgt2	malý protein bohatý na glutamin s tetratrikopeptidovými repetitivy	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein
SGTA	malý na glutamin bohatý tetratricopeptid	small-glutamine-rich tetratricopeptide protein
SNAREs	rozpuštěné NSF (N – ethylmaleimide senzitivní faktor) vázající proteinové receptory	soluble NSF (N-sensitive factor) Attachment Protein Receptor
SQC	prostorová kvalitativní kontrola	spatial quality control
SR	SRP receptor	SRP receptor
SRP – RN	SRP/RNC (ribosomální nascentní řetězec) komplex	SRP/RNC (ribosome nascent chain) complex
SRP	částice rozpoznávající signál	signal recognition particle
TA	(C) - terminálně ukotvený	(C) - tail-anchored
TRC40	40kDa část TMD rozpoznávacího komplexu	40kDa component of the TMD recognition complex
TMD	transmembránová doména	transmembrane domain
Trx-like	thioredoxinu - podobný	thioredoxin-like
Ubl4A	ubikvitinu - podobný 4A	Aubiquitin - like 4A
UGGT	glykoprotein-glukosyltransferáza	glycoprotein glucosyltransferase

UPR	odpověď na nesbalené proteiny	unfolded protein response
UPS	ubikvitin-proteozomální systém	Ubiquitin-proteasom system
VKOR	vitamín K epoxid reduktáza	vitamin K epoxide reductase
WRB	bazický protein bohatý na tryptofan	tryptophan-rich basic protein
XBP1proc	X box vázající protein-1	X-box-binding protein 1

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Kvalitativní kontrola	2
2.1. V CYTOPLASMĚ	2
2.1.1. Juxt nukleární kompartmenty kvalitativní kontroly – JUNQ.....	3
2.1.2. Tělíška pro nerozpustné proteiny - IPODs.....	3
2.1.3. Agresomy	3
2.2. ASYMETRICKÁ DĚDIČNOST POŠKOZENÝCH PROTEINŮ	3
2.3. V ENDOPLASMATICKÉM RETIKULU	4
2.3.1. Ko-translace.....	5
2.3.2. Glykosylace.....	11
2.3.3. Formování disulfidických můstků – Protein disulfid-izomeráza.....	11
2.3.4. Chaperony.....	16
2.3.5. ERAD dráha.....	17
3. Kalciová rovnováha a ER stresová odpověď'	21
3.1. ODPOVĚĎ NA NESBALENÉ PROTEINY (UPR)	22
4. Členění a struktura glutamátových receptorů.....	24
3.2. ČLENĚNÍ PODLE ANTAGONISTY	25
4. Neurodegenerativní onemocnění.....	26
4.1. Alzheimerova choroba.....	26
4.2. Parkinsonova choroba	27
4.3. Huntingtonova choroba.....	27
5. Shrnutí.....	29
6. Seznam literatury	30

1. Úvod

Kvalitativní kontrola (QC) je systém, který zahrnuje množství drah a enzymů a kontroluje každý krok v buněčné syntéze DNA, RNA i proteinů (Chen *et al.*, 2011).

Tento systém má několik stupňů kontroly: na úrovni transkripce, translace, sbalení proteinu a tvorby oligomerů. Dráhy kvalitativní kontroly jsou lokalizované v různých částech buňky (Arlt *et al.*, 1996; Gottesman *et al.* 1997). V této bakalářské práci se zaměřím na části kontroly kvality lokalizované v cytosolu a organelách, zvláště pak v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Endoplasmatické retikulum (ER) využívá systém kontroly kvality pro sledování změn konformace proteinů zvaný ER Quality Control (ERQC) (Hurtley & Helenius, 1989). Tento systém dokáže rozpoznávat pouze proteiny, které jsou sbaleny správně a jsou tedy v nativní konformaci. Tato konformace je pro protein nejméně energeticky náročná (Hammond & Helenius, 2006). Proteiny v nativní konformaci jsou dále upravovány a transportovány do Golgiho aparátu (GA), kde probíhají konečné úpravy. Poté může být protein zabudován do některého typu buněčné membrány, nebo může sloužit celý, či jako podjednotka, enzymu při intracelulárních procesech.

Chybně sbalené proteiny jsou rozpoznány a translokovány z ER pomocí transportérů zvaných člunky do cytoplasmy (Stoller & Shields, 1989). V cytoplasmě se na ně váží enzymy – chaperony. Ty mají dvě funkce, a to opětovné sbalení proteinů a doprovázení špatně sbaleného proteinu k proteasomu, kde dochází k jejich degradaci. Protein, který nemá nativní konformaci je rozpoznáván proteiny (ubikvitin ligázou), které jsou schopny připojit malé molekuly ubikvitinu s vysokou afinitou pro špatně sbalené proteiny. Ubikvitin zastává roli markeru/značky pro následnou vazbu chaperonu v cytosolu a translokaci vedoucí k degradaci proteinu (Kirisako *et al.*, 2006; Hao Dong *et al.*, 2013; Hammond & Helenius, 2006). Tento proces se jmenuje dráha degradace vázaná na endoplasmatické retikulum (z angl. ER - associated degradation pathway (ERAD) (Kopito, 1997). Díky těmto drahám je riziko zařazení špatně sbalených proteinů do běžných procesů v buňce velice malé, avšak jediná chyba v této kontrolní dráze, může být příčinou velice závažných onemocnění (Ellgaard & Helenius, 2003).

Jako většina proteinů, i proteiny glutamátových receptorů prochází kvalitativní kontrolou, a to jak cytoplasmatickou, tak i kontrolou endoplasmatického retikula. Chyby v syntéze a ve strukturním uspořádání glutamátových receptorů způsobené poruchou některých ze složek kontrolních drah jsou podstatou neurodegenerativních onemocnění, jejichž příkladem jsou Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a mnohé další.

Cílem této práce je popsat kvalitativní kontrolu a její poruchy, které jsou podstatou některých vážných neurodegenerativních onemocnění (Baloyannis, 2014).

2. Kvalitativní kontrola

2.1. V cytoplasmě

Kvalitativní kontrola je soubor kontrolních mechanismů, které fungují jako monitorovací zařízení pro syntézu proteinů v buňce. Lidské buňka obsahuje asi bilion proteinových molekul. Translace těchto proteinů se účastní kolem 3 milionů ribozomů v každé buňce (Duncan & Hershey, 1983), kteří mohou přeložit až 6 aminokyselin (AA) za sekundu. Překlad proteinů je energeticky nejnáročnějším procesem, v buňce spotřebovává až 75% její energie (Lane & Martin, 2010). Ribozomy jsou komplexem, který je tvořen ribozomální RNA (rRNA) a pomocnými proteiny. Většinou jej tvoří malá a velká ribozomální podjednotka. Mezi prokaryotickým a eukaryotickým typem ribozomu je jedním z rozdílů velikost podjednotek. Velikost je definována hodnotou sedimentačního koeficientu, který udává rychlost sedimentace částice při centrifugaci a udává se v jednotkách Svedberg [S] (Svedberg et al., 1993). Prokaryotický typ ribozomu se značí jako 70S a eukaryotický jako 80S. Ribozomy obsahují jednu třetinu rRNA a dvě třetiny proteinů (Pestova et al., 1998). rRNA je zodpovědná za proces translace, zatímco většina ribozomálního proteomu, běžně až 300 proteinů, zodpovídá za správnost, kvalitu a účinnost translace. Evolučně je zajímavé, že již Archea, která mají jedny z nejjednodušších ribozomů, mají již kolem 50 různých ribozomálních proteinů. Tyto proteiny mají schopnost snižovat množství mutací na úrovni posunu čtecího rámce, a to až na jednu chybu na 10 000 aminokyselin (AA) (Zaher & Green, 2009). Buňka produkuje až 10^9 proteinů a přibližně 10^6 z nich obsahuje chyby.

Je možné, že chyby jsou monitorovány právě pomocí ribozomálních podjednotek, pomocných faktorů a hlavně substrátu ribozomu - mRNA. Tyto složky regulují rychlost translace, díky konformacím, které mRNA vytváří. Jedná se například o vlásenky a další spoje/vazby mezi nukleotidy. Z pomocných faktorů zpomalují translaci také chaperony, které dokážou držet mRNA ve stabilní konformaci (Gloge et al., 2014).

Pokud je protein rozpoznán jako chybný, dochází ke ko-translační ubikvitinaci. Ubikvitin je molekula, která se skládá ze 76 AA. Proteiny jsou ubikvitinovány na nascentním N-konci a to nejčastěji na lysinu. Ubikvitin často vytváří polyubikvitinové řetězce, čímž se zvětšuje výstražný signál proteinu pro degradaci. Tento mechanismus je součástí kvalitativní kontroly v cytoplasmě a zároveň je i součástí dráhy ERAD (Ciechanover & Schwartz, 2002; Swatek & Komander, 2016).

K redukci chyb po translaci proteinů přispívají i další systémy buněčné kvalitativní kontroly. Nejprozkoumanějšími systémy jsou juxtannukleární kompartmenty CQ (JUNQ) a tělíška pro nerozpustné proteiny (IPODs), dále velkou roli hrají i agresomy a další (Johnston et al, 2012; Kaganovich et al, 2009).

2.1.1. Juxt nukleární kompartmenty kvalitativní kontroly – JUNQ

JUNQ je cytosolický systém kvalitativní kontroly, kde jsou shromažďovány špatně sbalené proteiny, které jsou však rozpustné v cytoplasmě. Směrování proteinů do JUNQ předchází jejich ubikvitinace, která probíhá již během translace a tyto proteiny jsou dále určené k novému skládání nebo k degradaci (Kamhi-Nesher et al., 2001).

Ubikvitinované proteiny se do JUNQ systému dostávají po aktinových mikrotubulech nejspíše pomocí proteinových motorů a JUNQ sám o sobě tvoří jakési přechodné skladiště, které brání vlivu špatně sbalených proteinů na buněčné dělení a na dalšími procesy, před jejich degradací (Kaganovich et al., 2009). Dále bylo prokázáno, že proteiny jsou z JUNQ exportovány do blízkého okolí s velkou koncentrací chaperonů a proteosomů také po aktinovém vlákne (Kamhi-Nesher et al., 2001).

2.1.2. Tělíska pro nerozpustné proteiny - IPODs

IPODs jsou kompartmenty lokalizované též v cytoplasmě, avšak oproti JUNQ obsahují agregáty proteinů a amyloidy, které jsou nerozpustné a je potřeba je z buňky eliminovat jiným postupem než proteiny rozpustné. Tyto proteiny jsou pro buňku obzvlášť nebezpečné. V IPODs byly ko-lokalizovány s autofágními proteiny i proteiny teplotního šoku (Hsp), které opět pomáhají v degradaci a pravděpodobně i opravnému balení těchto proteinů (Kaganovich et al., 2009).

2.1.3. Agresomy

Agresomy jsou obrovská juxt nukleární tělíska, která jsou formovaná mikrotubulární sítí a propojená s mikrotubulárním organizačním centrem (MTOC). Obsahují agregované proteiny, chaperony i proteosomální podjednotky. Agregáty proteinů jsou do nich směrovány pomocí dyneinového motoru. V agresomech probíhá sekvestrace proteinů dle vlastností určujících jejich toxicitu a probíhá zde i autofágie toxických proteinů. Některé proteiny jsou však dále směrovány k degradaci v lysozomech (Johnston et al., 2012).

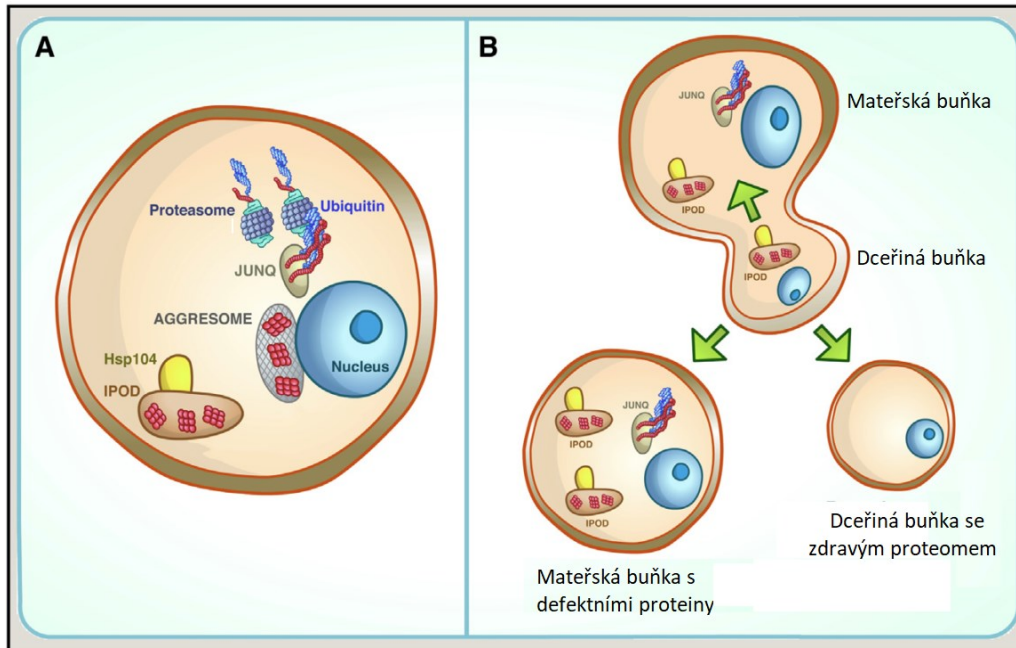
Existuje řada dalších kompartmentů, které se liší svými specifikacemi a také signálními drahami. Ale zatím nejsou propojení mezi jednotlivými kompartmenty popsána a je velmi pravděpodobné, že ani veškeré kompartmenty zapojené v cytosolické kvalitativní kontrole nebyly ještě odhaleny. Je však zřejmé, že existuje dynamický vztah mezi nenativními a nativními proteiny.

2.2. Asymetrická dědičnost poškozených proteinů

Každá buňka během svého života nastřádá velké množství poškozených proteinů. Otázkou však je, co se s nimi stane po cytokinezi. Pokud se buňka dělí, tyto proteiny většinou zůstávají v mateřské buňce a dceřiné buňce předávány nejsou. Této dědičnosti se říká asymetrická dědičnost (Aguilaniu et al., 2003).

Mechanismus této asymetrické dědičnosti spočívá v tom, že poškozené proteiny se spojí do agregátů, které rozpozná Hsp 104. Ten naváže tyto agregáty na aktinová vlákna, a proto nejsou tyto agregáty schopné přejít do dceřiné buňky. Pokud se i tak podaří některé agregáty přesunout do dceřiné buňky, funguje v ní ještě další mechanismus, kterým je dceřiná buňka schopná poslat po aktinových vláknech tyto agregáty zpět mateřské buňce (Coelho & Tolić, 2015; Aguilaniu et al., 2003).

Díky tomuto mechanismu může dceřiná buňka, bez chybných proteinů, začít nový cyklus (Obrázek 1).

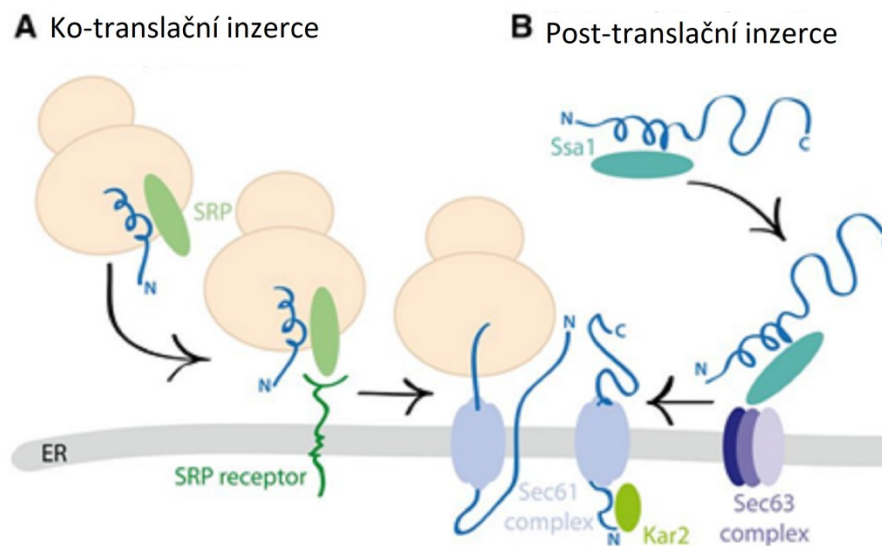


Obrázek 1 Schéma buněčné asymetrické dědičnosti, A. buňka se zobrazenými kompartmenty - juxtannukleární kompartment (JUNQ), depozita nerozpustných proteinů (IPOD) a agresomy. B. zobrazení výsledku asymetrické dědičnosti (*převzato a modifikováno z Wolff et al., 2014*).

2.3. V endoplasmatickém retikulu

Endoplasmatické retikulum je organela, která se vyskytuje i u těch nejjednodušších eukaryotických systémů. Zodpovídá za biosyntézu jedné třetiny proteomu. Uvnitř ER se balí proteiny, s funkcí v membránách a lumen různých organel (GA, endosomy, lysozomy), v cytoplasmatické membráně a proteiny sekreční dráhy, které slouží např. v mezibuněčné signalizaci (Wolff et al., 2014).

Aby se tyto proteiny složily správně, využívá ER – kvalitativní kontroly (ERQC), která je asociována s ERAD a autofágickou degenerací (Kopito, 1997). Tyto dráhy jsou také úzce propojeny s buněčnou a vápníkovou homeostázou ER (Kuznetsov et al., 1992). Proteiny se do ER dostávají dvěma způsoby – ko-translačně a post-translačně (Obrázek 2) (Wolff et al., 2014).



Obrázek 2 Schéma ko-translační a post-translační inzerce sekrečních proteinů do ER, A/ ko-translační inzerce, B/ post-translační inzerce (převzato a modifikováno z Barlowe & Miller, 2013).

2.3.1. Ko-translace

Ve většině případů přispívá k translokaci do membrány ER N-terminální signální sekvence, která je rozpoznána částicí rozpoznávající signál (SRP). SRP signální sekvence jsou velmi rozdílné u většiny organismů co do délky, tvaru i složení aminokyselin (von Heijne, 1985). V jejím jádře se většinou vyskytuje 8-12 hydrofobních aminokyselin, které přednostně tvoří α helix, který je zásadní pro rozpoznání této sekvence SRP (Hatsuzawa et al., 1997). Tato sekvence je také specifická svou prahovou úrovní hydrofobicity, která by mohla být jedním z hlavních faktorů umožňující signální sekvenci předurčit dráhu SRP (Ng et al., 1996).

SRP je ribonukleoproteinový komplex lokalizovaný v cytoplasmě, který nasedá na N-terminální konec nascentního polypeptidového řetězce. Komplex SRP, nascentního proteinu a ribozomu nasedá na SRP translokon a dojde k translokaci polypeptidu na cílové místo během translace (Gilmore et al., 1982; Ng et al., 1996; Shan & Walter, 2005). Savčí SRP komplex je složen ze 7SL RNA a 6 proteinových podjednotek. Tento celek se dělí do dvou strukturních domén, a to Alu a S doménu. S doména zahrnuje oblast 7SL RNA a proteinové podjednotky SRP19, SRP54, SRP68 a SRP72. Alu doména obsahuje helikální 3-5 7SL RNA a SRP9–SRP14 podjednotkové heterodimery. Některé podjednotky a jejich funkce jsou vysoce konzervované u prokaryotických i eukaryotických organismů (Gundelfinger et al.,

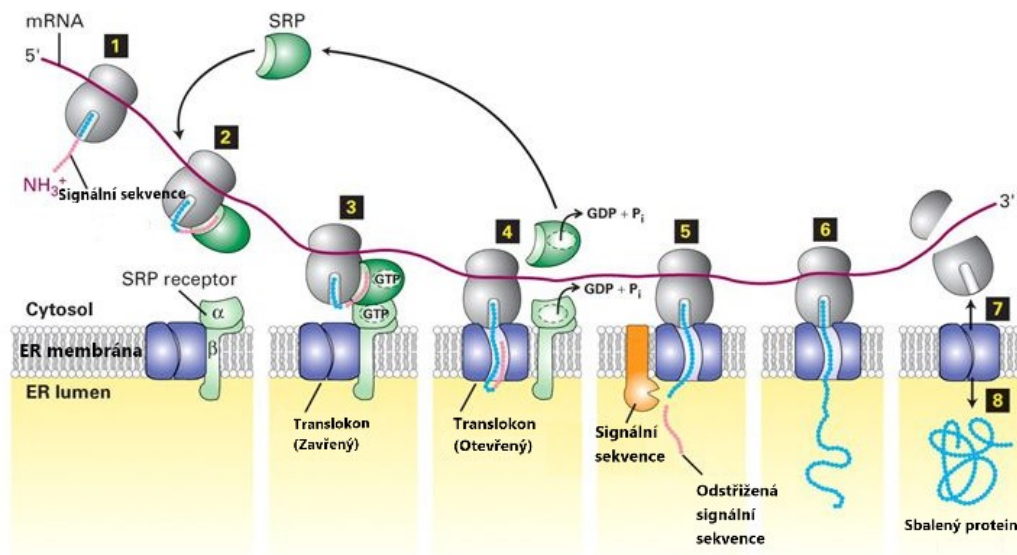
1983; Walter & Blobel, 1983). Důležitou a vysoce konzervovanou složkou SRP je S doménová podjednotka SRP54 (Maeshima et al., 2001). Tato podjednotka hraje hlavní roli při proteinovém cílení během ko-translace (Siegel & Walter, 1988). Důležitou roli zastává při vzájemných interakcích SRP s ribozomem, rozpoznávání signální sekvence a GTP-dependentní interakce SRP se SR. Tyto procesy společně určují správný přenos komplexu ribozomálního řetězce na translokon (Connolly & Gilmore, 1989). SRP54 má tři domény; C-koncovou α -helikální doménu bohatou na metionin (M doména), N-terminální doménu (N doména) a GTPázovou doménu (G doména). Domény N a G jsou těsně zabaleny a interagují s SRP receptorem (SR) (Freyman et al., 1997). M doména se skládá ze čtyř amfipatických helixů uspořádaných okolo malého hydrofobního jádra. V tomto hydrofobním jádře se nachází hydrofobní žlábk, který se podílí na vazbě signální sekvence a arginin bohatý motiv, který se podílí vazbě na SRP RNA (Keenan et al., 1998).

Navázání SRP probíhá ve fázi, kdy je rostoucí nascentní AA řetězec stále připojen k ribosomu a probíhá jeho translace. Tímto navázáním zabraňuje SRP vystavení peptidové hydrofobní signální sekvence ven do cytosolu, čímž zabrání jeho chybné agregaci. SRP receptor váže jak ribozomy bez SRP, tak se SRP, ale pokud polypeptid má na N-konci SRP, váže se k receptoru s vysokou afinitou (Flanagan et al., 2003). Komplex SRP a ribozomální nascentní komplex (SRP – RNC), složený ze SRP, translatovaného polypeptidu a ribozomu poté reaguje s ER membránovým SR.

SR receptor se skládá z dvou podjednotek – α SR podjednotky, což je periferní ER membránový protein a β SR podjednotky. β SR, je integrální membránový protein, který má jednu transmembránovou doménu uloženou v membráně ER (Schwartz & Blobel, 2003). C-terminální oblast α SR je velice podobná N a G doménám SRP54 a také má GTPázovou aktivitu. SRP54 interaguje s α SR, společně tvoří dimer, u kterého se protilehle váží GTP (Rapiejko et al., 1997a). Tím vzniká otevřený komplex GTP cyklu. Nastávají konformační změny proteinů, které umožňují SRP přenos RNC na translokon (Zhang et al., 2008). Bylo prokázáno, že pro přesunutí RNC na translokon je zapotřebí vazby nukleotid trifosfátů na SRP54 i na α SR podjednotky (Rapiejko et al., 1997b). Dochází ke změně z otevřeného stavu na uzavřený a též k hydrolyze GTP. Po hydrolyze je komplex SR – SRP rozpuštěn (Zhang et al., 2009).

Komplex Sec61 je kanál, pomocí jehož proteiny prochází do ER nebo jsou integrovány do ER membrány. Komplex Sec61 má 3 podjednotky: α podjednotka slouží jako pant – uzavírá/otevívá kanál, jedna z jejích podjednotek také tvoří záklopku, která kanál uzavírá. γ – podjednotka prochází diagonálně oběma polovinami α -podjednotky. β – podjednotka nemá zatím objasněnou funkci (Mothes et al., 1994). Kanál má tvar přesýpacích hodin, je tvořen 6 hydrofobními zbytky, jejichž řetězce směřují radiálně dovnitř translokonu (Zimmer et al., 2008). Ten je v neaktivním stavu zúžený a po aktivování se rozšíří, tak aby jím mohl projít nesložený protein. Translokon se částečně otevírá, s největší pravděpodobností, pomocí ribozomu, který se něj váže. To způsobí posunutí záklopkové domény α podjednotky a částečné otevření brány. Díky tomuto částečnému otevření, je umožněno dostat se SRP rozpoznávací sekvenci

do tunelu translokonu, kde se naváže na TM doménu Sec61 α podjednotky. Tím dojde k destabilizaci interakcí α -podjednotky, rozšíření translokonu (Wilkinson et al., 2010; Plath et al., 1998) a γ -podjednotka se vzpříčí mezi panty α -podjednotky, v důsledku čehož



Obrázek 3 Schéma ko-translokace proteinů přes membránu ER (převzato a modifikováno dle *Molecular cell biology – Sixth Edition 2008*).

se kanál nemůže uzavřít (Maillard et al., 2007). SRP rozpoznávací sekvenční je během pokračující translace peptidu skrz translokón odštěpena pepidázou (Marius, 2002) (Obrázek 3). Je možné, že na regulaci translokónu se podílí i chaperon ER Hsp70 - BiP (z angl. binding immunoglobulin protein). Data ukazují, že se mohou vázat na lumenární smyčku a translokón uzavřít (von Heijne, 1985).

2.3.1.1. *Post-translační translokace proteinů*

Post-translační translokace je proces, kdy protein s dokončenou syntézou v cytosolu je přenesen přes membránu dovnitř buněčné organely, tedy do lumen ER (Cross et al., 2009). Tento proces efektivní post-translační translokace byl objeven u kvasinek na prekursoru párovacího faktoru alfa (PpaF), který se translokují do mikrosomů. Následné experimenty potvrdily, že stejný proces také existuje v savčích buňkách (Hansen et al 1986; Schlenstedts et al., 1992).

Kvasinkové proteiny, které jsou translovány touto drahou, jsou méně hydrofobní, takže se na ně nemůže připojit SRP sekvenční (Ng et al., 1996) a potřebují k translokaci jiné cytosolické složky a adenosin trifosfát (ATP). Tento proces je tedy ATP dependentní. Při této translokaci může pomáhat i chaperon Hsp70, který udržuje proteiny ve stavu vhodném k translokaci (Hansen et al., 1986).

U savčích buněk je tento evolučně konzervovaný proces obdobný. Proteiny, které jsou translokovány touto drahou, jsou většinou tak malé, že se nestačí vytvořit N-koncová doména a navázat SRP před ukončením translace a bylo dokázáno, že jsou SRP nezávislé. Dále potřebují, stejně jako kvasinkové proteiny, cytosolické složky (TRC40, kalmodulin, atd.) a ATP (Shao & Hegde, 2011; Mfiller, 1990). Jako první byl nalezen u savců prekurzor včelího jedu prepromellittinu, který má řetězec pouze o délce 70AA (Müller & Zimmermann, 1987).

Posledním krokem post-translační translokace sekrečních proteinů je podobně jako u ko-translokace, navázání na klasický Sec61 komplex. Rozdíl je, že tento protein doprovází translokační komponenty zvyšující kapacitu translokonu (Deshaien et al., 1991)

2.3.1.2. *Post-translační translokace membránových proteinů*

Proteiny ukotvené C-koncovou doménou (z angl. Tail-anchored, TA) jsou transmembránové proteiny, u kterých byla jako prvních prokázána post-translační translokace (Abell et al., 2004). Tyto proteiny se skládají z dlouhé N-koncové domény, která ční do cytosolu, jediné transmembránové domény (TMD), lemované bazickými aminokyselinami a krátkým (max. 30 aminokyselin) C koncovým segmentem (Borgese et al., 2003). TMD je hydrofobní, alfa helikální struktura, která je tvořena ~20 aminokyselinami. Tato oblast je lokalizována blízko C-konce polypeptidu, a proto je translace ukončena ještě před vstupem do translokonu. Tato kategorie proteinů je velice četná a variabilní, patří do ní například rozpustné NSF proteinové receptory (z angl. soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs)). Bylo zjištěno, že TA proteiny, jsou schopné post-translační translokace nezávislé na SRP sekvenci, ale také nezávislé na Sec61. Způsobů, kterými se TA proteiny dostávají do ER, je více, v této práci se zaměřím pouze na dráhu navádění vstupu TA proteinů GET (z angl. Guided Entry of TA proteins), která je nejvíce prozkoumaná a evolučně konzervovaná jak u kvasinek, tak u savců (Kutay et al., 1995; Plath et al., 1998).

2.3.1.3. *GET dráha*

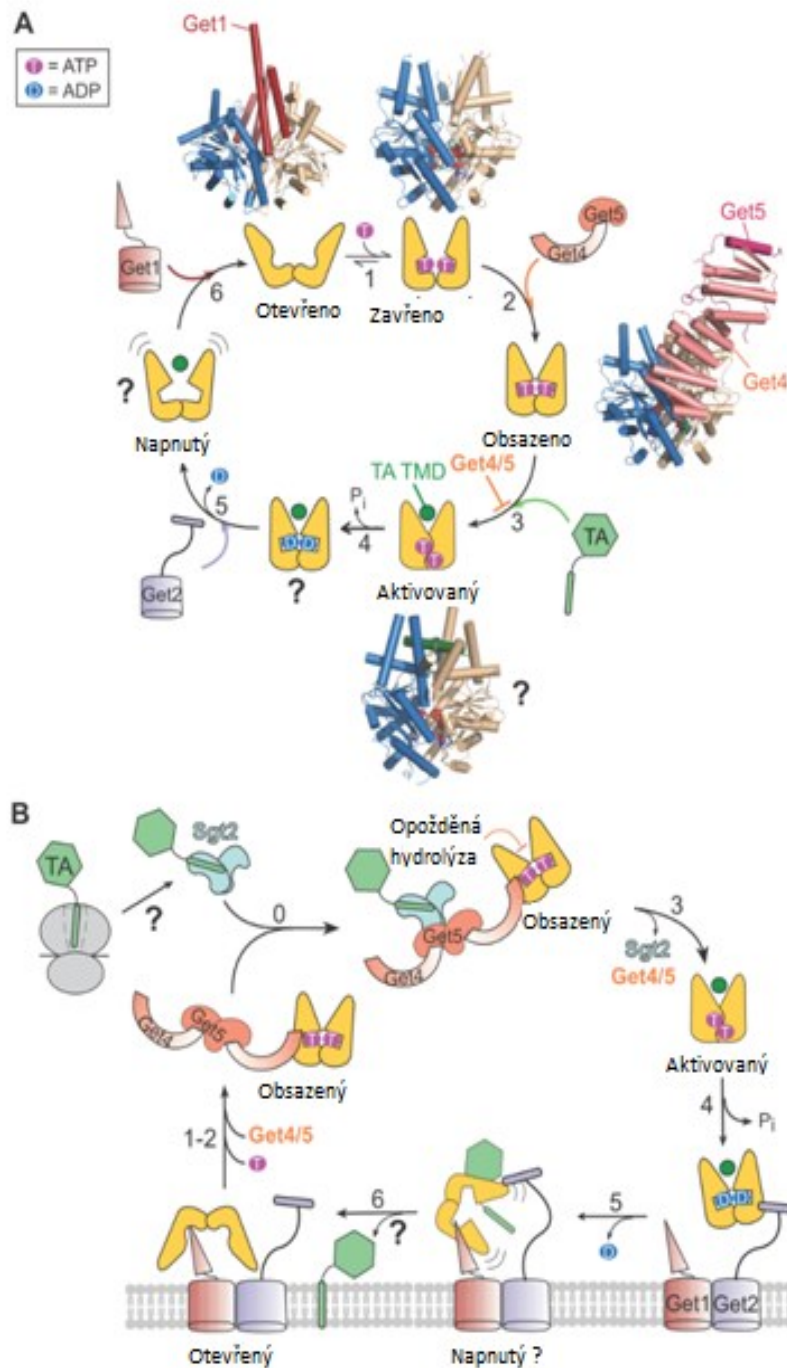
GET dráha je intenzivně zkoumána u kvasinek, zatímco méně informací je dostupných pro savčí buňky. U kvasinek většina TA proteinů je na ribozomech rozpoznána proteinem Sgt2 (z angl. a small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein). Tento protein z rodiny chaperonů se navazuje na TM doménu a chrání TA proteiny před agregací v cytosolu. Sgt2 je v komplexu s dalšíma dvěma proteiny GET4 a GET5. Z tohoto komplexu je TA protein předán na protein GET 3. Tato ATPáza má dvě role. ATP se váže na GET 3 a mění jeho konformaci z otevřené na polo-otevřenou (Suloway et al., 2012). Po navázání TM domény do hydrofobního kanálku GET3, dochází k hydrolýze ATP a konformace GET 3 se mění na uzavřenou. GET3 přeneše TA protein na membránový receptor, který je složen z proteinů GET1 a GET2. Tento receptor je vysoce selektivní pouze pro TA proteiny. GET1 a GET2 jsou transmembránové proteiny se třemi TMD. Heterodimer GET1 a GET2 interaguje pomocí dlouhé cytosolické domény GET2, která váže GET3 a přiblíží ho s navázaným TA proteinem ke GET1. GET1

se navazuje způsobem spirálového navinutí (z angl. coiled-coil), otevírá GET3 dimer a ruší vazbu substrátu v kanálu GET3. Po předání substrátu ATP indukuje disociaci GET3 z membrány a celý cyklus se opakuje (Obrázek 3) (Denic, 2012).

U savců tato dráha začíná zachycením TMD domény TA proteinu pomocí Bag6 (z angl. a protein encoded by BC-2- associated athanogene 6) (Kuwabara et al., 2015). Bag6, není homologní k zatím žádnému nalezenému kvasinkovému proteinu. Je součástí komplexu složeného z Ubl4A (kvasinkový GET4) a TRC35 (kvasinkový GET5) (Room et al., 2015; Wang, et al., 2010). Na Bag6-Ubl4A-TRC35 komplex se slabě váže SGTA (kvasinkový Sgt2). SGTA rovněž rozpoznává TMD doménu a patrně umožňuje, že Bag6-Ubl4A-TRC35 komplex s SGTA se váže na TMD doménu TA proteinu ještě před ukončením translace (Winnefeld et al., 2006; Wang, et al., 2010). *In vitro* studie ukázala, že po dokončení syntézy TMD domény se zvyšuje afinita Bag6 k TA proteinu. Také se ukazuje, že po syntéze TMD domény, se translace zpomaluje, nejspíše proto, aby se Bag6-Ubl4A-TRC35 komplex stihl navázat před jejím ukončením (shrnuto v Denic, 2012). TA protein je poté přenesen na TRC40 (40kDa component of the TMD recognition complex, kvasinkový GET3) (Leznicki et al, 2010). TRC40 patrně interaguje a předá substrát na membránový protein WRB, který je částečně homologní ke kvasinkovému GET1 (z angl. tryptophan-rich basic protein) (Schuldiner et al., 2008). GET2 u savčích buněk nebyl nalezen, avšak možným ekvivalentem je CAML (z angl. calcium-modulating cyclophilin ligand) (Yamamoto & Sakisaka, 2015). Mechanismus vlastní inkorporace TMD TA proteinů do membrány ER není známa (Obrázek 4).

Další dráhou, která není dosud příliš prozkoumaná, je inkorporace TA proteinů do membrány ER pomocí chaperonů Hsp40/Hsc70 (Rabu et al., 2009). Některé TA proteiny např. cytochrom *b₅*, se

mohou inkorporovat do membrány i neasistovaně tj. bez přispění dalších cytosolických faktorů (z angl. unassisted pathway) (Colombo et al.,2009).



Obrázek 4 Schémata konformační změn GET cyklu: A kvasinkový cyklus, B savčí cyklus (převzato z http://shangroup.caltech.edu/research_02_GET.html)

2.3.2. Glykosylace

2.3.2.1. N-glykosylace

Kovalentní vázání glykanů na N-konec proteinů je jednou z hlavních úloh ER, vyskytuje se až u 90 % všech glykoproteinů. Základní složkou N-glykosylace je dolichol, který je vytvářený cis-prenyltransferázou. Dolichol je fosforylovaný dolicholkinázou na dolicholfosfát-Dol-P (Swiezewska & Danikiewicz, 2005; Welti, 2013). Tento isoprenoidový lipid je lokalizován na membráně ER a má důležitou roli jako přenašeč oligosacharidů (Bugg & Brandish, 1994). Na dolicholfosfát-Dol-P se poté postupně navazují aktivované cukry a dolichol-P cukry, tvořící Glc3Man9GlcNAc2 oligosacharidový řetězec (Schwarz & Aebi, 2011). Tento oligosacharidový řetězec je poté přenesen na membránovou kotvu, kde vzniká N-glykosidická vazba (Orlean et al., 1988). Polypeptidy vstupující do lumen ER jsou kovalentně modifikovány připojením předem vytvořeného oligosacharidu Glc3Man9GlcNAc2 na asparaginové postranní řetězce Asn-Xxx-Ser/oligosaccharyltransferázy (OST) (Kean, 1985). Glukózové zbytky N-glykanů jsou odstraněny pomocí glukosidáz I a II, čímž se generují monoglukosylované oligosacharidy (GlcMan9GlcNAc2) (Grinnat, 1979). Takové N-glykany jsou poté rozpoznány chaperony, kalnexinem (CNX) nebo kalretikulinem (CRT), které zabraňují agregaci a pomáhají proteinu správně se složit. Odříznutím dalšího glukózového zbytku glukosidázou II dochází k uvolnění N-glykanů z chaperonů. UDP-glukóza / glykoprotein-glukosyltransferáza (UGGT) rozpoznává konformaci uvolněných glykoproteinů a pokud protein nedosáhl správné konformace, UGGT glykosyluje N-glykan znovu, aby se opět uvolnil pomocí CNX / CRT a sbalil do nativní konformace. Tento proces se několikrát opakuje, ale pokud protein přesto nezaujme správnou konformaci, je poslán ERAD dráhou zpět do cytoplasmy, kde je degradován (shrnuto v Aebi, 2013; Schwarz & Aebi, 2011).

2.3.2.2. O-glykosylace

O-glykosylace, je iniciována nejčastěji v GA. Tato post-translační úprava se nachází zejména na cytoplasmatických, ale i jaderných proteinech. Na aminokyseliny serin nebo threonin kompletně sbaleného proteinu je připevněn monosacharid N-acetylglukosamin (GlcNAc) glykosydicou vazbou. Enzym účastnící se této reakce je O-GlcNAc transferáza. Při O-glykosylaci se připojené glykany neprodlužují. GlcNAc může být z nativního proteinu odstraněn a znovu přidán. O-glykosylace se podílí na regulaci buněčné signalizace a expresi proteinů v reakci na stresové podmínky buňky (Van Den Steen et al., 1998).

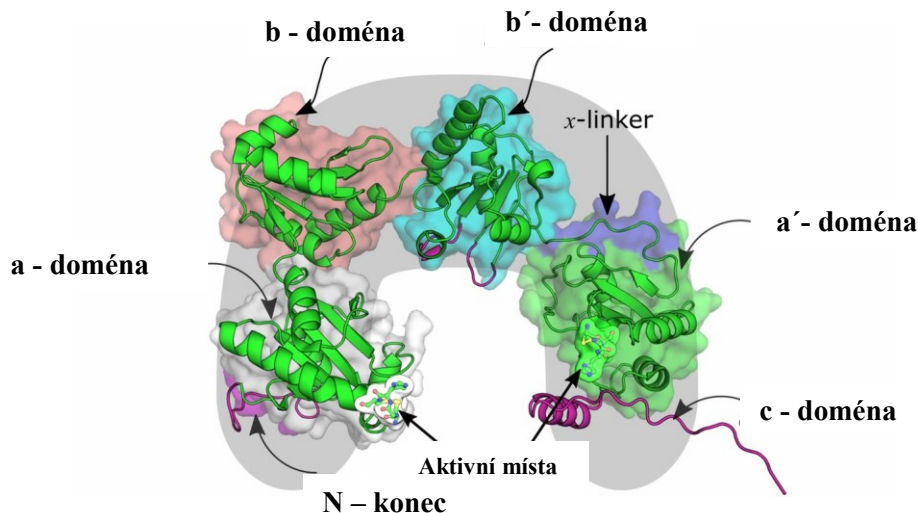
2.3.3. Formování disulfidických můstků – Protein disulfid-izomeráza

Disulfidické můstky patří mezi vazby nekovalentní. Jedná se o vazbu mezi dvěma molekulami cysteinu, které stabilizují protein v určité konformaci. Jsou rozhodující pro správnou biosyntézu a funkci mnoha

proteinů. Dále jsou významné pro usnadnění sbalení velkých proteinových multi-komplexů a systém také jejich pomocí reguluje redox-dependentní funkce, jako odpověď na změny (např. stres) v buňce (Wilkinson & Gilbert, 2004).

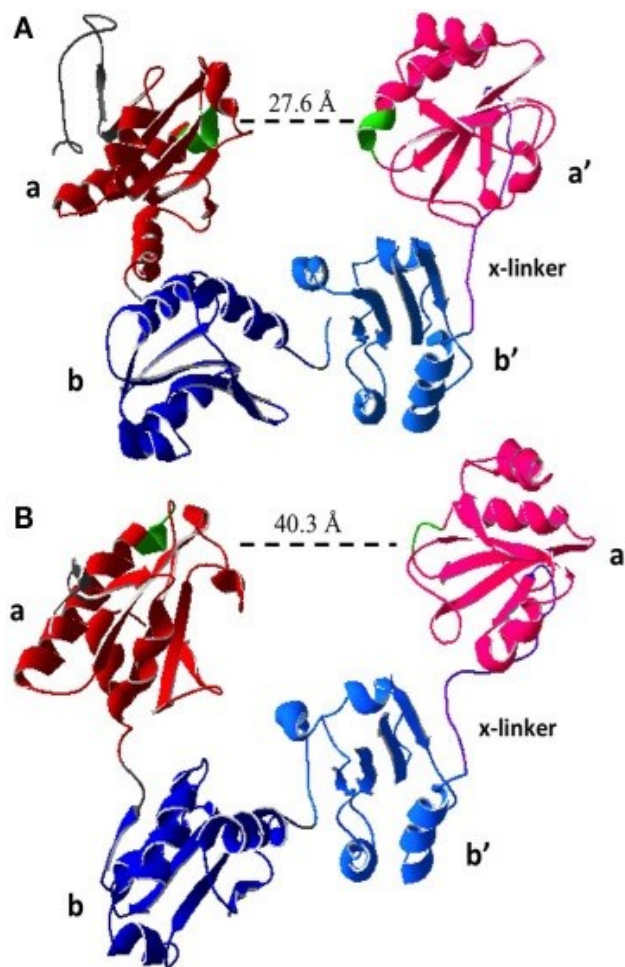
Spontánní vazby mezi cysteiny ale nemusí být vždy žádané, jelikož mohou znesnadňovat zaujmutí nativní konformace proteinu. K tomu, aby proteiny byly schopné izomerací, posunů, ale i redukci vazeb, slouží enzym protein disulfid-izomeráza (PDI) rodiny thiol-disulfid oxidoreduktáz, která byla objevena v roce 1964 (Edman et al., 1985; Goldberger et al., 1963).

V cytoplasmě závisí formování disulfidických můstků na redukované či oxidované formě tripeptidu glutationu, který obsahuje molekulu cysteinu vázanou na glycin. V cytosolu převažuje jeho koncentrace v redukované formě (GSH). Pro udržování koncentrace GSH je v cytoplasmě přítomna glutathion reduktáza interagující s nikotinamidadenindinukleotidfosfátem (NADPH).



Obrázek 5 Schéma rozložení domén PDI reduktázy (převzato a modifikováno Neves, Fernandes, & Ramos, 2017).

Dalším cytoplasmatickým enzymem je thioredoxin, který se také účastní redukce disulfidických můstků. Thioredoxin reguluje thioredoxin reduktáza, závislá opět na NADPH. Pro správnou translokaci do ER nesmí být na proteinu přítomna žádná disulfidická vazba (Bánhegyi et al., 1999; LaMantia & Lennarz, 1993; shrnuto v Frand et al., 2000).



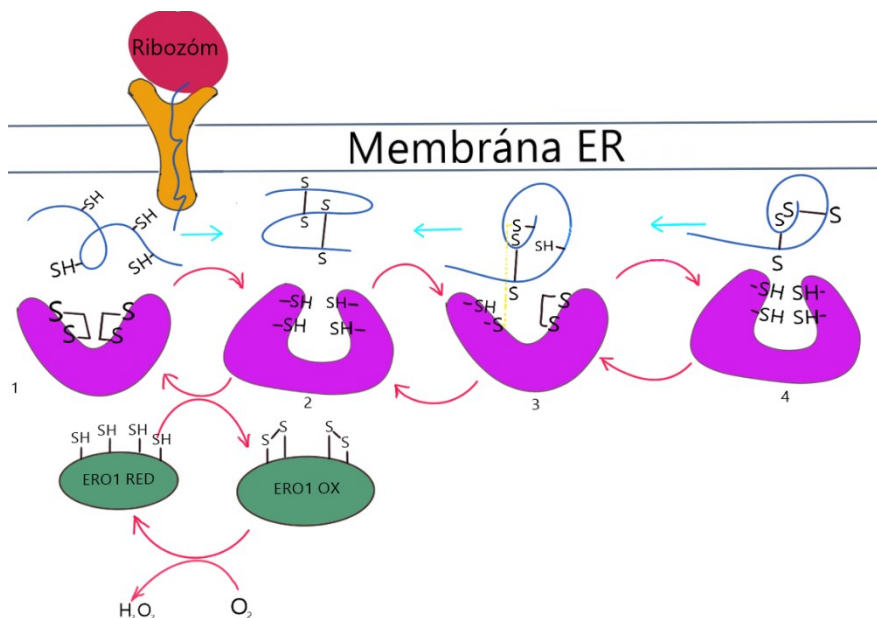
Obrázek 6 Schéma struktury PDI oxidoreduktázy: A uzavřená konformace, B otevřená konformace (převzato a modifikováno z *Ali Khan & Mutus, 2014*).

V ER je oxidativní prostředí, které je vhodné pro oxidaci volných sulfanylových skupin – SH navázaných na cysteinu pomocí cysteinových můstků. Rovnováha redukované a oxidované formy glutathionu je opačná než v cytoplasmě. V ER je vysoké procento oxidované formy (GSSG) a malé procento výskytu thioredoxinu, což podporuje tvorbu disulfidických můstků (Hwang et al., 1992). PDI je enzym, který v ER katalyzuje úpravy disulfidických můstků, tj. jejich tvorbu (oxidační reakce), ale také jejich zrušení (redukční reakce). Na rozdíl od thioredoxinu, PDI thiol-disulfid oxidoreduktázy jsou méně stabilní a proto častěji pouze vymění u již vzniklého disulfidického můstku jeden z partnerských cysteinů, místo toho, aby rozrušil a jinde opět vytvořil, nový disulfidický můstek (Frandsen et al., 2000). Proteiny, se kterými PDI reduktáza interaguje, jsou dvojího druhu: proteiny, které slouží buď jako akceptory a nebo jako donory elektronu. PDI enzym obsahuje čtyři thioredoxin-podobné (Trx-like) domény „a“, „b“, „a'“, „b'“ (Obrázek 5 a 6). Domény „a“ a „a'“ mají specifický, pro PDI charakteristický, motiv CysXXCys (CXXC), který představuje katalytickou aktivní doménu (Chivers et al., 1998). PDI má charakteristický tvar písmena U (Obrázek 5 a 6). Katalytické domény, které jsou proti sobě na koncích. „b“ a „b'“ domény, jsou neaktivní hydrofobní Trx-like domény. „b'“ doména

obsahuje hlavní místo pro navázání polypeptidů. V oxidované formě má PDI konformaci otevřenou, v redukované formě ji má uzavřenou. Změna konformace se mění díky rotaci vnitřní inter-domény okolo „a“ a „b“ domény. Pokud je PDI v otevřené konformaci, je vazebné místo širší. To znamená, že je PDI schopná vázat velké polypeptidy, které jsou sbalené, ale nemají ještě zformované disulfidické můstky. Pokud je ale PDI v uzavřené konformaci, vazebné místo je mnohem menší a PDI je schopná vazby pouze na menší, nebo méně sbalené polypeptidy (Nguyen et al., 2008; Freedman, 1998). Pro zpětnou oxidaci PDI slouží ER-rezidentní oxidáza. Tento enzym slouží jako katalyzátor formování disulfidických můstků. Příkládá disulfidové můstky na nově syntetizované proteiny, které přenáší oxidační ekvivalenty pro PDI proteiny. PDI poté přenesou disulfidické můstky na nascentní polypeptidy.

2.3.3.1. Enzymy v katalytické dráze PDI v ER

Prvním enzymem, který hraje důležitou roli při formování disulfidických můstků je ER oxidoreduktin 1 (ER01). ER01 je oxidoreduktáza, která přispívá k formování disulfidických můstků *de novo*. U savců byl nalezen ER oxidoreduktin 1 α (ve všech tkáních) (Ero1 α) a ER oxidoreduktin 1 β (tkáňově specifický) (Ero1 β). Ero1 proteiny jsou flavoenzymy, které používají flavinadeninindinukleotid (FAD) jako kofaktor pro transport elektronů z PDI na molekulární kyslík. Ve struktuře Ero1 najdeme zabudované cysteinové zbytky, které jsou zodpovědné za katalytický cyklus. Na flexibilní smyčce se vyskytuje pár cysteinových zbytků – cysteinových člunků, které tvoří aktivní vnější stranu (Obrázek 7). Vnitřní aktivní stranu tvoří dva cysteiny na C terminálním konci Ero1, a zároveň slouží pro vázání kofaktoru FAD (Ramming & Appenzeller-Herzog, 2012; Kim et al., 2012).



Obr. 7: Schéma formace disulfidických můstků; 1/ nesbalený protein, 2/ protein v nascentní konformaci, 3/ transientní stav proteinu s PDI, 4/ špatně sbalený protein.

Transport elektronu začíná tím, že přejde z PDI na cysteiny flexibilní smyčky Ero1, dále je elektron dopraven na vnější aktivní stranu, kde dojde k vazbě na FAD, odkud se poté přesune na konečný akceptor – kyslík. Tato dráha musí být regulována, jinak by docházelo ke zvýšení hladiny hydrogenových peroxidů, které mohou být pro buňku velmi nebezpečné, jelikož jsou schopny narušovat její odpověď na stresové faktory. Proto je celý systém regulovaný negativní zpětnou vazbou, kdy se na Ero1 začleňují cysteiny, které nejsou katalytické, a tedy nedokáží přenášet elektrony na C-terminální konec (shrnutí v Sevier & Kaiser, 2008).

Peroxiredoxin IV (PexIV) je enzym, který chrání buňku před peroxidem produkovaným Ero1. Využívá H_2O_2 jako konečný elektronový akceptor a spojuje je rozdělením disulfidické vazby na PDI proteinech. Rozpad H_2O_2 zahrnuje sulfenylaci peroxidovaného cysteinu na sulfenylovou kyselinu. Díky tomuto rozpadu se mění konformace modifikovaného peroxidovaného cysteinu, což vede k meziřetězcové disulfidické vazbě. Tato vazba může být opět redukována pomocí PDI proteinů thiol-disulfidovou výměnou. Na každou molekulu kyslíku použítou během Ero1-zprostředkované oxidace PDI proteinů, jsou tvořeny dvě disulfidické vazby na nově syntetizovaných proteinech. Sulfenylovaný cystein může být dále oxidován reversibilně na sulfinic a poté ireverzibilně na sulfonic (Tavender & Bulleid, 2010).

Glutation peroxidázy 7/8 (GPxs) jsou enzymy, využívající GSH pro redukci H_2O_2 . Tyto enzymy interagují s Ero1 a podporují formování disulfidických můstků na redukované substráty za přítomnosti PDI a H_2O_2 . Je možné, že reakční mechanismus těchto peroxidáz je zprostředkován přes sulfenylovaný cysteinový intermediát, který je tvořen aktivní stranou cysteinu pomocí H_2O_2 . Tento sulfenylovaný cystein reaguje s redukovaným cysteinem na PDI a vytváří se přechodný disulfidický můstek, který je poté přesunut na druhý cystein PDI (shrnutí v Brigelius-flohé & Maiorino, 2013; Wang, et al., 2014).

Vitamín K epoxid reduktáza (VKOR) je důležitou složkou ER membránově-rezidentního vitamínu K-dependentního γ -karboxylového systému, který hraje důležitou roli v koagulaci krve. Je to transmembránový protein, který se skládá za čtyř smyček. Obsahuje dva cysteinové páry, jeden zabudovaný do membrány ER a druhý, který je vestavěný do smyčky proteinu vystavené do lumen ER. Tyto cysteiny katalyzují některé redoxní reakce katalytického cyklu. VKOR redukuje vitamín K nebo jeho epoxidové deriváty jako výsledek formování disulfidického můstku motivu CXXC zabudovaného v membráně ER. Tento můstek se dále přesunuje na pár cysteinů umístěných na smyčce VKOR. Ty následně mohou přijmout elektron od Trx-like proteinů. Existují dva modely tohoto složitěho komplexu, model s čtyřmi smyčkami má smyčku s cysteinovým párem v lumen ER, přijímá elektrony od PDI proteinů a vytváří intermediáty s PDI - podobnými proteiny zakotvenými v membráně ER. Oproti tomu, třísmyčkový model má tuto smyčku v cytosolu, kde je elektron na cysteinovém páru. Konečným výsledkem je, že tento elektron je předán na Trx-like proteiny v cytosolu a oba cysteinové páry jsou oxidovány (Rutkevich & Williams, 2012; Schulman et al., 2010).

2.3.4. Chaperony

Základní funkcí chaperonů, je rozpoznávat a vázat proteiny, které se nachází v ne-nativní konformaci. Takové proteiny jsou dvojího druhu, proteiny s dosud nedokončenou biogenezí a chybně sbalené proteiny. Chaperony dokáží tyto proteiny udržet ve stabilní konformaci a tím zabraňují jejich agregaci (Ellis, 2013). U špatně sbalených proteinů je poté doprovází k místům, kde dochází k jejich opětovnému skládání nebo k degradaci. U proteinů s nedokončenou biogenezí je chaperony doprovází v drahách biogeneze od translace proteinu, translokace až po konečné úpravy v ER a GA. U většiny komplexů se chaperony navazují a jsou odpoutány pomocí disociace a hydrolýzy ATP (Fink, 2018).

ER obsahuje chaperony, které se dělí do několika rodin. Hsp jsou proteiny, které jsou produkovány ve zvýšené míře při buněčném stresu. Patří mezi ně Hsp40, Hsp70 a Hsp90. V ER se také nachází chaperony kalnexin, kalretikulín a proteiny thiol-disulfid oxidoreduktázové rodiny (Bergeron et al., 1994; Hartl, 1996; Georgopoulos, 1993).

Hsp70 je rodina molekulárních proteinů, které hrají roli při procesech proteinového skládání a mají slabou ATPázovou aktivitu (Georgopoulos, 1993). Mají dvě hlavní funkční domény. N-koncová funkční skupina váže a hydrolyzuje ATP na ADP. ATPázová aktivita je závislá na přítomnosti Mg^{2+} a K^+ . C-koncová centrální doména je určena k vazbě substrátu tj. polypeptidů (substrate binding domain, SBD) a na ní navazuje úsek obsahující šroubovicové struktury (Martin & Hartl, 1997). Hlavním proteinem této rodiny v ER je imunoglobuliny vázající protein BiP (z angl. binding immunoglobulin protein), který hraje roli v různých částech QC. Váže nascentní proteiny a pomáhá jim při zaujmutí správné konformace. Vyskytuje se také v ERAD dráze, pokud systém není schopen některé chybně sbalené proteiny převést do nativní konformace (Blond-Elguindi et al., 1993). Dalším chaperonem rodiny Hsp70, vyskytujícím se v ER, je glukózou-regulovaný protein 170 (GRP170). Ten se, s největší pravděpodobností, podílí na skládání a sestavování imunoglobulinů. Díky tomu je slibným kandidátem pro imunoterapeutické vakcíny proti určitým druhům rakoviny (Chen et al., 1996; Wang et al., 2001).

Hsp40 rodina obsahuje více než 100 různých enzymů. Má vysoce konzervovanou J doménu, která má až 78 AA zbytků (Cheetham & Caplan, 1998). J doména je vázaná na oblast bohatou na Gly/Phe a dokáže stimulovat BiP ATPázovou aktivitu *in vitro* (Chamberlain & Burgoyne, 1997). Příkladem chaperonu této rodiny je DnaJ, která má nejméně čtyři konzervované regiony reprezentující potenciální funkční domény (Cyr & Douglas, 1994). Většina těchto chaperonů spolupracuje s Hsp70 jako ko-chaperony (Chamberlain & Burgoyne, 1997) a dokáže vázat nesbalené proteiny nebo nascentní řetězce (Cyr et al., 1994).

Hsp90 je vysoce konzervovaná skupina chaperonů, které jsou esenciální od bakterií až po savce. V ER savčích buněk se vyskytuje Grp94 homologní s HtpG v *E. coli* (Spence & Georgopoulos, 1989).

Tento enzym tvoří dimery (Rossmann et al, 1974) a často se nachází v komplexu s jinými chaperony (Jakob & Buchner, 1994). N-koncová doména má speciální ATP/ADP vazebné místo. Toto místo je také schopné vázat geldamycin. Geldamycin váže nukleotidy na Hsp90 a není schopný vázat nesprávně či nekompletně sbalené proteiny (Prodromou et al., 1997).

Peptidyl-prolyl izomerázy (z angl. peptidyl-prolyl isomerase (PPIase)) jsou enzymy, dělí se do tří rodin: cyklofiliny, FK506 – vázající proteiny (FKBP) a parvuliny. První dvě se nazývají také imunofiliny a jsou přítomny v ER (Bang et al., 2000). Katalyzují cis/trans isomeraci peptidyl-prolyl můstků (Bracher, 2014).

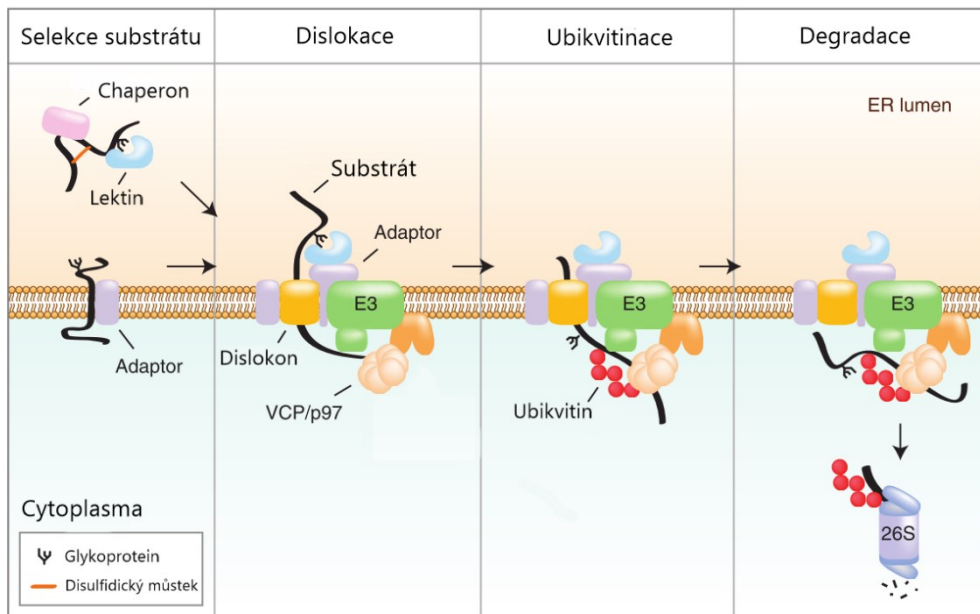
Kalnexin (CNX) a kalretikulín (CRT) jsou lektinové chaperony, které se vážou na N-glykany glykoproteinů. CNX je membránový ER-rezidentní molekulární chaperon, sekvenčně homologní k tomuto chaperonu, je chaperon CRT, který je solubilní ER chaperon (Bergeron et al., 1994). Oba dva proteiny pomáhají správnému sbalení proteinů a účastní se procesů QC (Suh et al., 1992).

Thiol-disulfid oxireduktáza je velká rodina enzymů, z nichž je nejznámější je PDI (Bracher, 2014). Je to důležitý kofaktor pro folding mnoha proteinů v ER (Freedman et al., 1994). PDI katalyzuje oxidaci, izomeraci a redukci disulfidických můstků pro jejich správné párování a tedy i pro správné sbalení proteinu (LaMantia & Lennarz, 1993).

2.3.5. ERAD dráha

ER-asociovaná dráha proteinové degradace neboli ERAD dráha je vysoce konzervovaná dráha od kvasinek až po savce (Foresti et al., 2013) a rostliny (Doblas et al., 2013). Slouží k retrográdnímu transportu nesbalených nebo špatně sbalených proteinů z lumen ER do cytoplasmy skrze translokony umístěné v membráně ER. Proteiny jsou poté zprostředkovaně degradovány přes ubikvitin v proteozomu (Ciechanover & Schwartz, 2002; Hampton, 2002). Degradace pomocí ERAD dráhy je komplexní proces, při kterém jsou vybrány defektní proteiny a degradovány pomocí ubikvitin-proteozomálního systému (UPS). ERAD má čtyři těsně spojené kroky zahrnující selekci substrátu, retranslokaci přes ER membránu, ubikvitinaci a proteozomální degradaci (Obrázek 8). Členové ERAD dráhy v lumen ER jsou propojeny s ER membránově vázanými ubikvitin ligázami. Tyto ligázy propojují

komponenty zodpovědné za rozpoznání defektních proteinů v lumen ER pomocí ubikvitin-proteozomální systému v cytoplazmě (Swanson et al., 2001).



Obrázek 8 Schéma čtyř kroků ERAD dráhy. Selekce substrátu, dislokace neboli retranslokace, ubikvitinace a degradace (převzato a modifikováno z de Verneuil et al., 1986).

2.3.5.1. *Selekce substrátu*

ERAD systém je zaměřen na proteiny, které jsou defektní z důvodu mutace, špatné translační inkorporace nebo neschopné zaujmout správnou nativní konformaci. ERAD je schopen regulovat i nadměrnou expresi některých specifických proteinů prostřednictvím metabolických signálů. Některé viry využívají ERAD systému tak, že modifikují syntézu určitých proteinů a díky tomu oslabí obranyschopnost buňky (Wiertz et al., 1996). AB toxiny produkované například při záškrtu a choleře využívají tuto dráhu (de Verneuil et al., 1986; Tsai et al., 2001).

Glykoproteiny, které prochází biosyntézou a jsou již v lumen ER, jsou postranslačně glykosylovány. Většinou jde o N-glykosylaci (kap. 2.3.2.2), kdy se na nascentní peptid váže $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Tento krok je důležitý pro defektní proteiny, které je třeba opět sbalit pomocí GSSH, nebo takový protein označit jako protein, který sbalit nelze a poslat ho na degradaci do cytosolu. Tohoto kroku se účastní glukosidázy I a II, které deglykosylují Glc_3 na Glc_2 . Na takto upravený glykoprotein se váží CNX a CRT chaperony, které usnadňují formaci disulfidických můstků pomocí PDI. Konečná deglykosylace

odstraňuje poslední Glc₁ a po tomto kroku se CNX a CRT již na upravený glykoprotein neváží (Clerc et al., 2009).

Proteiny, které nejsou v nativní konformaci, jsou opětovně glykosylovány pomocí UGGT. Tento enzym je vrátí do kroku, kdy jsou dostupné pro PDI, CNX a CRT (Frickel et al., 2002; Oka & Bulleid, 2013). Glykoproteiny, které nelze tímto cyklem změnit jsou pomocí manosidáz (např. kvasinková manosidáza Htm 1, u savců EDEM) označeny biochemickou značkou (1,6-spojenými manózami). Manosidázy pracují v komplexu s oxidoreduktázami, které redukují disulfidické můstky, což je důležité pro jednodušší manipulaci s defektními proteiny (Ushioda et al., 2008). Označené proteiny rozpoznává Yos9 (kvasinkový homolog OS9, XTP3-B) (Kim et al., 2005), signál však není dostatečný a je potřeba, aby chaperon Kar2 (kvasinkový homolog BiP) přenesl tento komplex na Hrd 3 (kvasinkový homolog SEL1), který má rovněž schopnost rozpoznat značku defektního proteinu (Denic et al., 2006; Kim et al., 2005). Nedávná práce (Goder & Melero, 2011) na kvasinkách ukazují, že i O-manosylace (typ O-glykosylace) nejspíš vytváří nevratné značky na defektních proteinech a je tedy podobně důležitá, jako výše popsaná N-glykosylace.

Rozpoznávací faktory proteinů jsou součástí E3 ligázového komplexu. Jsou zatím dva známé komplexy a každý z nich rozeznává pouze určité druhy proteinů. Zahrnují složku transmembránovou i složky lumenární: Hrd1 komplex a Doa10 komplex. Funkce jednotlivých členů komplexů jsou popsány v Tabulce č. 1 (Swanson et al., 2001; Wang et al., 2010).

Degradace ERAD substrátů je zprostředkována stejným obecným mechanismem, ale rozpoznání těchto substrátů zahrnuje různé faktory. Jednoduchý mechanismus zaměřený na určitý protein ERAD, je pomocí adaptéru specifického pro substrát. Příkladem drah je rozpoznávací mechanismus lidského cytomegaloviru, který kóduje vlastní adaptory pro hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex class 1 (MHC I)), který je poté přes ERAD dráhu degradován (Wiertz et al., 1996). Podobný mechanismus označuje CD4 pro degradaci v buňkách, které syntetizují membránový protein Vpu, kódovaný HIV. Vpu zde funguje jako adaptér i nosič, který se váže k E3 ligáze (Fujita et al., 1997).

Tab. 1 : Souhrn komponent v komplexech Hrd1, Doa10 a společných komponent pro oba dva komplexy.

Část	Funkce	Savčí homolog
<u>Hrd 1 komplex</u>		
Hrd1	E3 ligázová aktivita/retranslokace	HRD1, gp78
Hrd3	rozpoznávání substrátu, Hrd 1 stabilita	SEL1

Yos9	rozpoznávání substrátu	OS9, XTP3-B
Kar2	chaperonová aktivita rozpoznávání substrátu	Bip
Usa1	Hrd 1 a Der 1 oligomerizace	HERP
Der1	rozeznání a přenesení substrátu na Hrd 1, retranslokace ?	Derlin-1, -2, -3
<hr/>		
<u>Doa10 komplex</u>		
Doa10	E3 ligázová aktivita	TEB4
Ubc	E2 ubikvitin připojující aktivita	Ubc6, Ubc6e
<hr/>		
<u>Společné pro komplexy Hrd1 a Doa10</u>		
Ubc7	E2 ubikvitin-připojující aktivita	UBE2G1, UBE2G2
Cue1	navázání a aktivace Ubc7	
Ubx2	membránový vazebný faktor pro Cdc48	UBXD8
Cdc48	retranslokace substrátu a membránové uvolnění substrátu	p97/VCP
Npl4	Cdc48 cofactor	NPL4
Ufd1	Cdc48 cofactor	UFD1

Převzato a modifikováno z (Ruggiano et al, 2014).

Tyto mechanismy nejsou typické pouze pro viry, ale fungují i při patologických stavech u buněk *Drosophily* i buněk savčích (Zettl et al., 2011). Adaptér specifický pro substrát také funguje v regulovaném ERAD HMGR (3-hydroxy-3metylglutaryl-koenzym A reduktáza), což je klíčový enzym sterolové biosyntetické dráhy. Pro tuto dráhou jsou také nesmírně důležité adaptéry Insig 1 a Insig 2. Tyto adaptéry interagují s HMGR pouze v případě, že dochází k hromadění sterolových meziproductů (24,25-dihydrolanosterolu) v buňce. Při nižších koncentracích je HMGR stabilní a nenavazuje adaptory. Při vyčerpání buněčných sterolů, je stimulována ubikvitinizace Insig 1 komplexem E3 Gp78 ligázy. Pokud je hladina sterolů vysoká, Insig 1 se navazuje na membránový protein SCAP, což vede k jeho větší stabilitě (Foresti et al., 2013; Hampton et al., 1996; Jo et al., 2011; Song et al., 2005).

2.3.5.2. Retranslokace a ubikvitinace

Mechanismus retranslokace proteinů do cytoplasmy není dosud úplně objasněn, ale předpokládá se, že by se tohoto procesu mohl účastnit translokon Sec61, který hraje důležitou roli i při běžné translokaci proteinu (Burr et al., 2013; Wiertz et al., 1996). Dalším proteinem, který pravděpodobně vytváří retranslokační kanál je Hrd1, u něhož se ukazuje, že je nejspíše regulován dalšími faktory Hrd3, Usa1, Der1. Bez těchto faktorů Hrd1 neprovádí správnou selekci proteinů. Faktorem spojeným s translokací je také E3 ligáza, která nespíše interaguje s Hrd1 (Carvalho et al. 2011).

Na cytoplazmatické straně ER membrány jsou substráty ubikvitinovány, což umožňuje jejich rozpoznání pomocí komplexu Cdc48 / p97 ATPázy. VCP / p97 je ATPázy, složené z homohexameru Cdc48 / p97 a kofaktorů Ufd1 and Npl4. Aktivita ATPázy komplexu Cdc48 / p97 poskytuje energii k přesunutí ubikvitinovaných substrátů z ER membrány do cytosolu. Mechanismus, který spojuje ATP hydrolyzu s membránovou extrakcí substrátu, není stále jasný. Vedle komplexu Cdc48 / p97 hrají ATPázové podjednotky proteasomové regulační částice roli při retrotranslaci některých substrátů ERAD dráhy (Zhang et al., 2013; Jentsch & Rumpf, 2007).

Některé studie (Ye et al., 2001) naznačují, že následný proces ubikvitinace zahrnuje cykly ubikvitinace i de-ubiquitinace. V některých případech mohou být tyto cykly důležité pro zvýšení specifity rozpoznávání substrátu, což bylo prokázáno u Vpu-zprostředkované degradace CD4.

2.3.5.3. Degradace

Dislokační komplexy interagují se členy účastnící se ubikvitinace i membránové extrakce pomocí VCP / p97 a proteolytické degradace pomocí proteazomu (Zhang et al., 2013).

Většina faktorů hrajících roli v ERAD dráze není dosud plně prozkoumaná. Podrobnější rozbor jednotlivých hypotéz, definic a možných komponent hrajících roli v ERAD dráze, není možné v této práci z důvodu místa podrobněji rozebírat.

3. Kalciová rovnováha a ER stresová odpověď

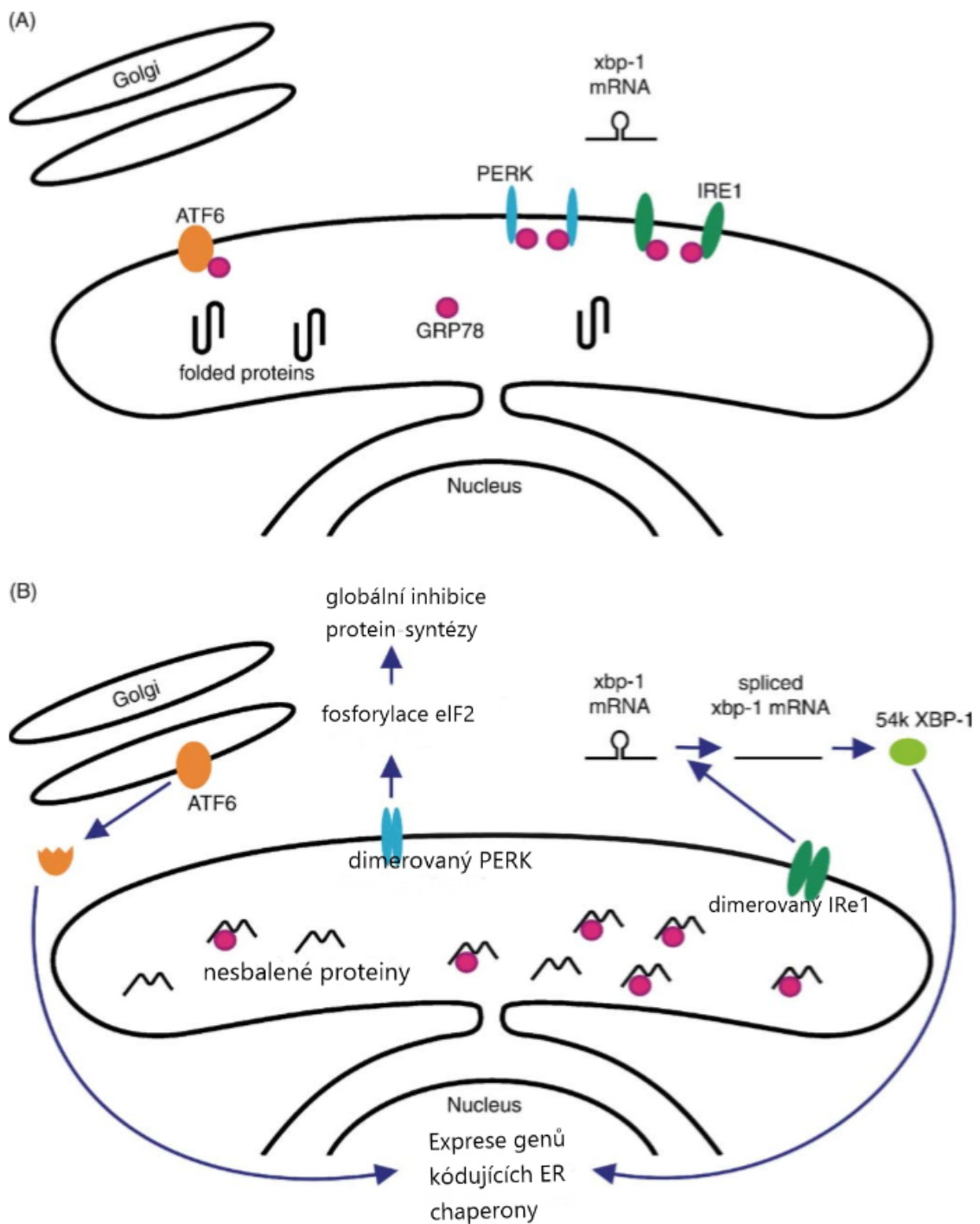
ER retikulum, kromě správného balení proteinů, udržuje kalciovou rovnováhu. Tyto dvě funkce jsou na sobě závislé. Jedná se výhradně o procesy závislé na vápníku, vyžadující pro správnou funkci jeho vysokou koncentraci (Kuznetsov et al., 1992). Když jsou tyto funkce narušeny, v ER lumen se hromadí nesbalené proteiny, které časem agregují. Tento patologický stav se nazývá ER stres.

Proteinové agregáty jsou charakteristickými znaky degenerativních poruch mozku. Byly nalezeny po přechodné cerebrální ischemii i v průběhu dalších degenerativních onemocnění. To naznačuje, že mechanismy spojené se skládáním a zpracováním proteinů jsou u takových onemocnění narušeny (Hu et al., 2000). Když je porušeno skládání proteinů, nefunguje ERAD dráha, případně dochází k chybám v dalších procesech zpracovávání proteinů, v důsledku čehož se v ER hromadí špatně sbalené proteiny. Po zaregistrování vyšší koncentrace těchto proteinů v lumen ER se aktivuje následná odpověď na nesbalené proteiny (UPR) (z angl. unfolded protein response) (Flynn et al., 1991).

3.1. Odpověď na nesbalené proteiny

UPR je vysoce konzervovaný proces odpovědi na zvýšení koncentrace nesbalených proteinů (Tirasophon et al., 1998). Hlavní funkcí tohoto procesu je obnovit funkci ER, snížením koncentrace nesbalených proteinů, které je potřeba zpracovat. Hlavními enzymy v této dráze jsou: RNA-aktivovaná proteinkináza-podobná ER kináze (PERK) (Harding et al., 1999) aktivační transkripční faktory 4 a 6 (ATF4 a ATF6) a inositol-vyžadující enzym 1 (IRE1), který je závislý na inositolu (Yoshida et al., 2001). Při běžné situaci je účinnost PERK, ATF6 a IRE1 potlačena na ně vázaným chaperonem GRP78, který se vyskytuje u lidí a je homologní s BiP. V podmínkách ER - dysfunkce ER GRP78 disociuje z PERK, ATF6 a IRE1 a váže se na nesbalené proteiny. Po disociaci chaperonu z PERK a IRE1 probíhá jejich oligomerace a autofosforylace, čímž se aktivují. ATF6 je rozštěpen proteázami a vzniká transkripční faktor. Aktivovaný PERK působí jako kináza, která specificky fosforyluje alfa podjednotku eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2a). Tato fosforylace působí jako inhibitor translace. Po fosforylaci IRE1 působí jako aktivní endonukleáza, která indukuje sestřih mRNA Xbp1. Tento sestřih způsobí, že místo původního proteinu je translatován protein X box vázající protein 1 (z angl. X-box-binding protein-1 (XBP^{proc})), který je více stabilní než původní protein. XBP1^{proc} funguje jako transkripční aktivační faktor, pro geny kódujících transkripci proteinů potřebných pro biogenezi ER proteinů. Aktivace syntézy těchto proteinů, včetně GRP78, je nutná k urychlení odstranění příliš vysoké koncentrace nesbalených proteinů v ER. Další účastníkem nezbytným pro tento proces je komplex obsahujícím protein-fosfatázu a protein indukovaný poškozením DNA (z angl. DNA damage-inducible protein (GADD34)). Tento komplex defosforyluje eIF2, díky čemuž by měla být zrušena translační represe indukovaná ER stresem (Novoa et al., 2001). Aktivace UPR je nutná, aby buňky mohly přežít stresové stavy spojené s dysfunkcí ER (Obrázek 9).

Pokud ER stres trvá příliš dlouho, iniciuje se proces apoptózy, na kterém se podílí ER-rezidentní kaspáza-12 (Nakagawa et al., 2000). Vedle této přímé apoptické dráhy vyvolané stresem ER prostřednictvím transkripčního faktoru CHOP (homologní s transkriptem 3 indukovatelným poškozením DNA (C/EBP)) a kaspázy-12, byla identifikována apoptická signalizace mezi ER a mitochondrií, která aktivuje tradiční apoptickou dráhu (Häcki et al., 2000).

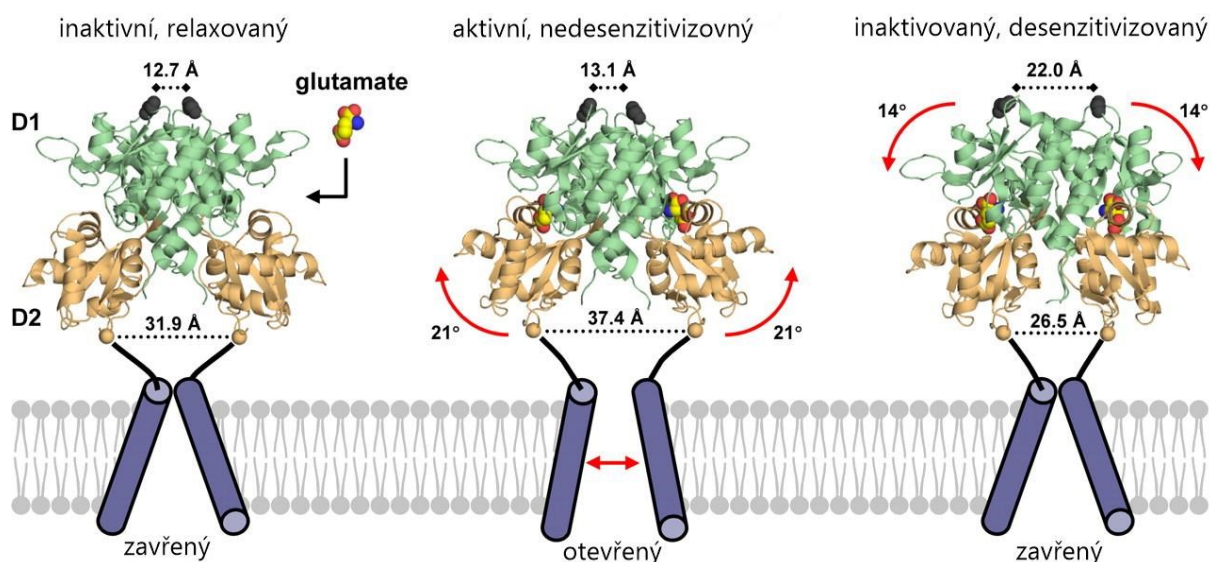


Obrázek 9 Schéma odpovědi na nesbalené proteiny v ER; A/ normální stav ER, B/ stresový stav v ER (převzato a modifikováno z Paschen & Mengesdorf, 2005).

4. Členění a struktura glutamátových receptorů

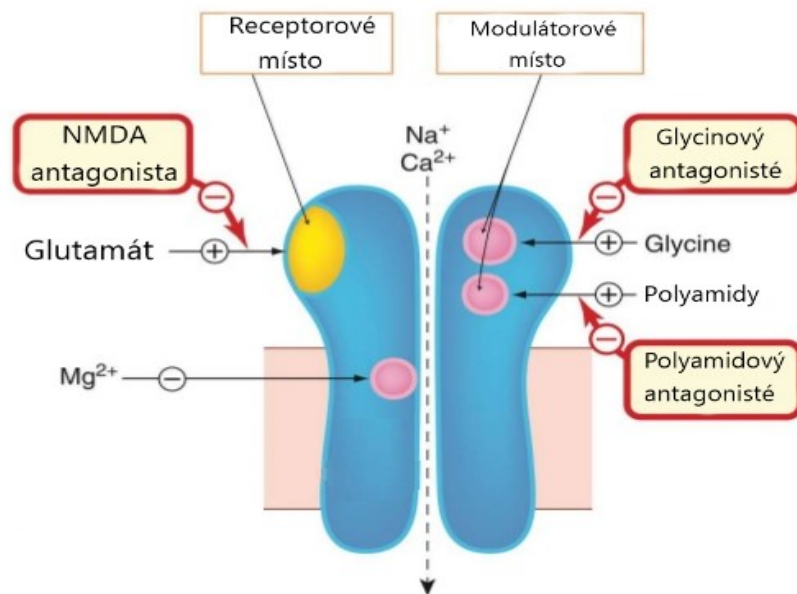
Glutamátové receptory jsou receptory vyskytující se na nervových buňkách savčí centrální nervové soustavy (CNS). Jsou aktivovány neuropřenašečem glutamátem, podle něhož dostaly svůj název. Glutamátové receptory se dělí na dvě skupiny, a to na receptory inotropní a metabotropní (Meyerson et al., 2014).

Iotropní glutamátové receptory (iGluRs) jsou receptory jejichž otevření či zavření je závislé na ligandu (z angl. ligand-gated) transmembránové iontové kanály. Zprostředkovávají excitační synaptický přenos v mozku obratlovců a hrají zásadní roli ve schopnosti organismu učit se a pamatovat si (Meyerson et al., 2014). iGluRs jsou složeny ze čtyř podjednotek, které tvoří centrální pór. Podjednotky iGluRs obsahují čtyři semi-autonomní domény: extracelulární amino(N)-terminální doménu (ATD), doménu vázající extracelulární ligand (LBD), transmembránovou doménu (TMD) a intracelulární karboxyl(C)-terminální doménu (CTD) (Nath et al., 1988).



Obrázek 10 Schéma struktury ionotropního glutamátového receptoru (převzato a modifikováno z Nath et al., 1988).

Metabotropní glutamátové receptory (mGluRs) jsou membránové proteiny spřažené s G – proteiny. Modulují pomalé synaptické dráhy přes intracelulární druhé posly. Struktura mGluRs zahrnuje N-terminální extracelulární doménu, extracelulární a tři intracelulární smyčky a cytoplazmatický C-konec oddělený sedmi vysoce hydrofobními oblastmi. Předpokládá se, že právě tyto oblasti jsou překryté lipidovou dvojvrstvou. N-terminální část receptoru obsahuje vazebné místo pro glutamát. Intracelulární domény interagují s G-proteiny, a tím je zprostředkován přenos signálu (Ferraguti & Shigemoto, 2006; Masu et al., 1991).



Obrázek 11 Schéma metabotropního NMDA receptoru (převzato a upraveno z <https://www.slideshare.net/VibhaManu/glutamate-receptors-69079362>).

3.2. Členění podle antagonisty

Ionotropní glutamátové receptory se dělí do čtyř skupin dle typu antagonistů, kterými jsou: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina (AMPA), N-methyl-D-aspartát (NMDA), kainátové (2-karboxy-3-karboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidin) a δ receptory (Nath et al., 1988).

První tři skupiny, reagují na vazbu ligandu otevřením póru specifického pro kationty. Po otevření póru následuje destabilizace pórových proteinů a uzavření póru. Tento proces trvá pouze milisekundy (Meyerson et al., 2014).

NMDA receptory jsou nejvíce exprimovány v CNS a jsou vysoce propustné pro kalciové ionty (Macdermott et al., 1986). Účastní se mnoha fyziologických, ale i patologických procesů. Tyto receptory lze řadit do subpopulací, které mají různé funkce a pravděpodobně i jejich role v patologických procesech je odlišná (Niciu et al., 2013). NMDA receptory tvoří heterotetramery složené ze čtyř podjednotek GluN1, GluN2A – GluN2D, GluN3A – GluN3B, které se mohou mezi sebou kombinovat (Yamamoto et al., 2015). Na rozdíl od ostatních druhů ionotropních glutamátových receptorů potřebují pro svou aktivaci ko-agonistu. Těmito ko-agonisty jsou glutamát a glycin. Bylo identifikována vazebná místa, která pravděpodobně regulují otevření kanálů tvořených NMDA receptory, a to místa pro dva

povinné ko-ligandy (glutamát a glycin) a kationty (Mg^{2+} , Zn^{2+} a H^+) (Kleckner & Dingledine, 1988; Mayer et al, 1984).

AMPA receptorové podjednotky se nazývají GluR1-4. Tvoří homotetramery i heterotetramery (Meyerson et al., 2014). Při tvorbě tetramerního komplexu GluR1-4 s AMPA receptory zprostředkovávají rychlý synaptický přenos signálu. AMPAR-zprostředkované signály jsou rychle generovány, rychle šířeny a rychle se rozkládají. Oproti tomu aktivace NMDA receptorů vyvolává delší fázi depolarizace, která může trvat několik set milisekund. Předpokládá se proto, že silné excitační postsynaptické potenciály jsou řízeny aktivací AMPAR, zatímco NMDA receptory, mají díky receptorově senzibilizujícím farmakokinetikám čas pro prostorovou a časovou sumaci u mnoha postsynaptických vstupů (Niciu et al., 2013).

Kainátové receptory jsou homo – nebo heterotetramerní komplexy složené z podjednotek GluR5-7 a KA1-2. V heterologních systémech může docházet k tvorbě homoreceptorů složených pouze z podjednotek KA1 nebo KA2. Tyto receptory avšak neplní funkci iontových kanálů, ale zdá se, že mají schopnost modulace signálů. Oproti tomu receptory složené z podjednotek GluR5-7 fungují pouze jako kanály závislé na ligandu (Niciu et al., 2013).

δ -receptory tvoří homotetramery a skládají z podjednotek GluD1 nebo GluD2 (Nath et al., 1988).

4. Neurodegenerativní onemocnění

Kvalitativní kontrola skýtá řadu regulačních mechanismů, které se podílejí na správné biosyntéze glutamátových receptorů (iGluRs). Změna či absence komponenty v některé z těchto regulačních drah, může mít vliv na strukturu i funkci iGluRs, což vede ke změnám a chybám synaptického přenosu glutamátu. Tyto změny mohou být důvodem vzniku neurodegenerativních onemocnění.

4.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění mozku. AD je charakteristická poškozením kognitivních funkcí, vyvíjející se neurodegenerací a tvorbou plaků obsahujících amyloid β ($A\beta$). Neurodegenerativní proces v AD je zpočátku charakterizován synaptickým poškozením doprovázeným ztrátou neuronů. Synaptická ztráta koreluje s kognitivní poruchou u pacientů s AD. Etiologie AD je multifaktoriální. Jedním z možných vysvětlení je, že synaptická patologie a defektní neurogeneze v AD souvisejí s postupným zvyšováním koncentrace oligomerů $A\beta$. Abnormální akumulace $A\beta$, vedoucí k tvorbě toxických oligomerů, je důsledkem nerovnováhy mezi úrovněmi produkce $A\beta$, agregace a degradace (Crews & Masliah, 2010; Glenner & Wong, 1984). Dalším možným důvodem je NMDAR signalizace. Nedostatečná signalizace vede k postupnému vymírání buněk, zatímco příliš mnoho signalizace způsobuje excitotoxicitu a neurodegeneraci. Proto se k léčbě

této nemoci používají také léky a obsahující memantin, což je antagonist glutamátu (Wang & Reddy, 2017).

AD je nejčastější příčinou demence. Obvykle je její nástup pomalý. Zpočátku mají pacienti problémy s vykonáváním každodenních běžných úkolů. Typická je neschopnost soustředění, zmatenost. Časem nastupuje problém s vyjadřováním. Pacientova osobnost se během progresu onemocnění mění a v konečném stádiu jsou pacienti neschopni samostatného života (Perry & Hodges, 1999).

4.2. Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je komplexní neurodegenerativní onemocnění. Je to jedno z nejběžnějších onemocnění tohoto typu v populaci. Vyskytuje se u lidí starších ~ 40let. Většina pacientů s PD trpí motorickými poruchami, zpomalením pohybu, třesením, poruchami v rovnováze. Dále mohou také trpět úzkostí, depresí, autonomní poruchou a demencí (Dawson & Dawson, 2009).

Při tomto onemocnění, dochází k úbytku neuronů v části středního mozku - *substantia nigra*. Ztráta neuronů vede k hlavním klinickým příznakům PD i rozsáhlé neuropatologii. Tyto neurony jsou významným producentem dopaminu, neurotransmiteru, který umožňuje přenos signálu mezi neurony. Nedostatek dopaminu je příčinou ztráty koordinace, ovládní pohybu i dalších patologických projevů (Braak et al., 2003).

Současné experimenty naznačují, že inhibice mitochondriálního komplexu I může být hlavní příčinou PD. Poruchy v komplexu I způsobují agregaci β -synucleinu, což přispívá k zániku dopaminergních neuronů. Jistou roli nejspíše v tomto onemocnění hrají i glutamátové NMDA, AMPA receptory i některé podtypy metabolotropních receptorů. Zvýšení neurotransmise související s hyperfosforylací NMDA podjednotek se podílí na vývoji a udržování časté komplikace u PD - Levodopa-indukované dyskineze u modelových zvířat. Avšak důkazy podporující souvislost mezi abnormální funkcí glutamátu a dyskinezi u pacientů s Parkinsonovou chorobou jsou nepřímé. Symptomy tohoto onemocnění je možné dnes již léčit, ale dosud neexistuje terapie, která by umožnila těmto symptomům předejít (Ahmed et al., 2011; Dawson & Dawson, 2009).

4.3. Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (chorea) (HD) je autozomálně dominantní, progresivní neurodegenerativní porucha. Může se projevovat různými způsoby, včetně nervových poruch spočívajících v mimovolních rychlých pohybech různých svalů, svalových křečích, špatné koordinaci, narušení kognitivních funkcí a behaviorálními obtížemi. Nejčastěji se onemocnění začne projevovat ve středním věku, často po těhotenství, ale může se projevit i kdykoli mezi 1. až 80. rokem života. Příčinou symptomů HD je mutantní gen kódující protein - huntingtin. Tento gen obsahuje, oproti genu nemutovanému, na svém 5' konci více násobné repetice CAG. Abnormální konec proteinu je připojen k polyglutaminovému řetězci s variabilní délkou na N-konci. Důkazy naznačují, že tato repetice způsobuje toxické zesílení jeho

funkce. Dalším důvodem tohoto onemocnění by mohlo být neuronální poškození díky nadměrné aktivaci NMDAR glutamátových receptorů excitačními aminokyselinami. Změna funkce NMDAR byla zaznamenána u kortikostriatálních synapsí myšího modelu HD. NMDAR zprostředkovaná toxicita je se více projevuje ve striatálních neuronech některých myších modelů HD, podobně jako buňky exprimující mutantní protein huntingtin (Nguyen et al., 2008).

HD má tři fáze, zdravé období, prediagnostické období a diagnostickou fázi. Zdravé období nepostřehnutelně přechází v prediagnostickou fázi, kdy lidé s HD vykazují jemné změny osobnosti, kognitivních funkcí a sebeovládání. V prediagnostické fázi mohou být jednotlivci podrážděni, depresivní, nespolehliví ve svém zaměstnání. Obtížné je vykonávat více věcí souběžně, začínají se projevovat poruchy paměti a s tím spojené úzkosti, popřípadně nespavost.

V diagnostické fázi se začínají projevovat nervové disfunkce (náhlé pohyby, křeče), špatná koordinace, zpomalení pohybu očí. Kognitivní dysfunkce nespočívá v narušení dlouhodobé paměti jako u AD, ale v narušení funkcí, jakými jsou organizování, plánování, kontrola nebo přizpůsobování se novým podmínkám a zpomaluje se získávání nových motorických dovedností. Tyto vlastnosti se časem zhoršují, zhoršuje se řeč, u které dochází k rychlejší progresi, oproti porozumění. Lidé s tímto onemocněním jsou vysoce rizikovou skupinou v páchání sebevražd. Bylo prokázáno, že až 9 % již v prediagnostických stádiích přemýšlí o sebevraždě (Walker, 2007).

5. Shrnutí

Procesy kvalitativní kontroly jsou zcela nepostradatelné pro všechny živé organismy od kvasinek až po savce i rostliny. Účastní se biogeneze proteinů nezbytných pro život organismu a zajišťují jejich správnou funkci. Jsou důležité pro vyřazování a degradaci špatně sbalených proteinů a jejich agregátů, které mohou být pro organismus toxické. Jsou schopné reagovat na výkyvy koncentrací nativních, sbalených, nesbalených i chybně sbalených proteinů a podle toho regulovat transkripci i translaci faktorů, které pomáhají udržovat rovnováhu mezi hladinami všech uvedených forem.

Výzkum v oblasti kvalitativní kontroly je velmi intenzivní. QC je zkoumána z mnoha pohledů a na mnoha úrovních. Jde však o velmi komplexní systém a tak zjistit všechny důsledky vyvolané jednou konkrétní změnou, není jednoduché. Zdaleka také ještě nejsou známy všechny mechanismy, které ovlivňují biosyntézu proteinů a jejich správné formování a monitoring. Již nyní však víme, že defekty v procesech QC hrají významnou roli při vzniku velmi častých neurodegenerativních onemocnění. Další výzkum vedoucí k detailnějšímu poznávání procesů a důsledků v jejich změnách, by nám mohlo umožnit kompletní pochopení vzniku těchto onemocnění a případné vyvinutí účinnějších symptomatických i presymptomatických terapií.

6. Seznam literatury

- A. Elisabeth Sauer-Eriksson & Tobias Hainzl (2003). S-domain assembly of the signal recognition particle, 64–70.
- Abell, B. M., Pool, M. R., Schlenker, O., Sinning, I., & High, S. (2004). Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO Journal*, 23(14), 2755–2764.
- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430–2437.
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., & Nyström, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, 299(5613), 1751–1753.
- Ahmed, I., Bose, S. K., Pavese, N., Ramlackhansingh, A., Turkheimer, F., Hotton, G., Brooks, D. J. (2011). Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias. *Brain*, 134(4), 979–986.
- Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., & Langer, T. (1996). The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell*, 85(6), 875–885.
- Baloyannis, S. J. (2014). Golgi apparatus and protein trafficking in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42, S153–S162.
- Bang, H., Pecht, A., Raddatz, G., Scior, T., Solbach, W., Brune, K., & Pahl, A. (2000). Prolyl isomerases in a minimal cell. Catalysis of protein folding by trigger factor from *Mycoplasma genitalium*. *European Journal of Biochemistry*, 267(11), 3270–3280.
- Bánhegyi, Lusini, Puskás, Rossi, Fulceri, Braun, Mile, di Simplicio, Mandl, B. (1999). Communication Preferential Transport of Glutathione versus Glutathione Disulfide in Rat Liver, (14), 12213–12216.
- Barlowe, C. K., & Miller, E. A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2), 383–410.
- Bergeron, J. J. M., Brenner, M. B., Thomas, D. Y., & Williams, D. B. (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(3), 124–128.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F., & Gething, M. J. H. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, 75(4), 717–728.
- Borgese, N., Brambillasca, S., Soffientini, P., Yabal, M., & Makarow, M. (2003). Biogenesis of tail-anchored proteins. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 6), 1238–1242.
- Braak, H., Tredici, K. Del, Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 4580(March 2003), 197–211.
- Bracher, A. (2014). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, volume number, pages.
- Brigelius-flohé, & Maiorino. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Glutathione peroxidases. *BBA - General Subjects*, 1830(5), 3289–3303.
- Bugg, T. D. H., & Brandish, P. E. (1994). From peptidoglycan to glycoproteins: Common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 119(3), 255–262.
- Burr, M. L., van den Boomen, D. J. H., Bye, H., Antrobus, R., Wiertz, E. J., & Lehner, P. J. (2013). MHC class I molecules are preferentially ubiquitinated on endoplasmic reticulum luminal residues during HRD1 ubiquitin E3 ligase-mediated dislocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14290–14295.
- Carvalho, P., Stanley, A. M., & Rapoport, T. A. (2011). Retro-translocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p, 143(4), 579–591.
- Ciechanover, A., & Schwartz, A. L. (2002). Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins in health and

- disease. *Hepatology*, 35(1), 3–6.
- Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D. M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T., & Aebi, M. (2009). Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 184(1), 159–172.
- Coelho, M., & Tolić, I. M. (2015). Asymmetric damage segregation at cell division via protein aggregate fusion and attachment to organelles. *BioEssays*, 37(7), 740–747.
- Colombo, S. F., Longhi, R., & Borgese, N. (2009). The role of cytosolic proteins in the insertion of tail-anchored proteins into phospholipid bilayers. *Journal of Cell Science*, 122(14), 2383–2392.
- Connolly, T., & Gilmore, R. (1989). The Signal Recognition Particle Receptor Mediates the GTP-Dependent Displacement of SRP from the Signal Sequence of the Nascent Polypeptide, 57, 599–610. časopis
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(R1), 12–20.
- Cross, B. C. S., Sinning, I., Lührink, J., & High, S. (2009). Delivering proteins for export from the cytosol, 10(aPRIL).
- Cyr, D. M., & Douglas, M. G. (1994). Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eukaryotic DnaJ homologue Ydj1. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9798–9804.
- Cyr, D. M., Langer, T., & Douglas, M. G. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(4), 176–181.
- Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease, 819(2003), 819–823.
- de Verneuil, H., Grandchamp, B., Romeo, P. H., Raich, N., Beaumont, C., Goossens, M., ... Nordmann, Y. (1986). Molecular analysis of uroporphyrinogen decarboxylase deficiency in a family with two cases of hepatoerythropoietic porphyria. *Journal of Clinical Investigation*, 77(2), 431–435.
- Denic, V. (2012). A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(10), 411–417.
- Denic, V., Quan, E. M., & Weissman, J. S. (2006). A Luminal Surveillance Complex that Selects Misfolded Glycoproteins for ER-Associated Degradation. *Cell*, 126(2), 349–359.
- Doblas, V. G., Amorim-Silva, V., Pose, D., Rosado, A., Esteban, A., Arro, M., ... Botella, M. A. (2013). The SUD1 Gene Encodes a Putative E3 Ubiquitin Ligase and Is a Positive Regulator of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(2), 728–743.
- Duncan, R., & Hershey, J. W. (1983). Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(11), 7228–7235.
- Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A., & Rutter, W. J. (1985). Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature*, 317(6034), 267–270.
- Ellgaard, L., & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3), 181–191.
- Ellis, R. J. (2013). Assembly chaperones: a perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1617), 20110398.
- Ferraguti, F., & Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 483–504.
- Fink, A. L. (2018). Chaperone-Mediated Protein Folding, 79(2), 425–449.
- Flanagan, J. J., Chen, J., Miao, Y., Shao, Y., Lin, J., Bock, P. E., & Johnson, A. E. (2003). Signal Recognition Particle Binds to Ribosome-bound Signal Sequences with Fluorescence-detected Subnanomolar Affinity That Does Not Diminish as the Nascent Chain Lengthens *, 278(20), 18628–18637.
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T., & Rothman, J. E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular

- chaperone BiP. *Nature*, 353(6346), 726–730.
- Foresti, O., Ruggiano, A., Hannibal-Bach, H. K., Ejsing, C. S., & Carvalho, P. (2013). Sterol homeostasis requires regulated degradation of squalene monooxygenase by the ubiquitin ligase Doa10/Teb4. *eLife*, 2013(2), 1–17.
- Frand, A. R., Cuozzo, J. W., & Kaiser, C. A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation, 8924(0), 203–210.
- Frand, a R., Cuozzo, J. W., & Kaiser, C. a. (2000). Pathways for protein disulfide bond formation. *Trends in Cell Biology*, 10(5), 203–210.
- Freedman, R. B., HIRST, T. R., & TUIITE, M. F. (1994). Protein Disulfide-Isomerase - Building Bridges in Protein- Folding. *Trends in Biochemical Science*, 19(August), 331–336. Retrieved from
- Freymann, D. M., Keenan, R. J., Stroud, R. M., & Walter, P. (1997). Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. *Nature*.
- Frickel, E.-M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K., & Ellgaard, L. (2002). TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 1954–1959.
- Fujita, K., Omura, S., & Silver, J. (1997). Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors [published erratum appears in J Gen Virol 1997 Aug;78(8):2129-30]. *J. Gen. Virol.*, 78(3), 619–625. Retrieved from
- Georgopoulos, C. (1993). Role of the Major Heat Shock Proteins As. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9, 601–634.
- Gilmore, R., Blobel, G., & Walter, P. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *The Journal of Cell Biology*, 95(3), 463–469.
- Glennner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3), 885–890.
- Gloge, F., Becker, A. H., Kramer, G., & Bukau, B. (2014). Co-translational mechanisms of protein maturation. *Current Opinion in Structural Biology*, 24(1), 24–33.
- Goder, V., & Melero, A. (2011). Protein O-mannosyltransferases participate in ER protein quality control. *Journal of Cell Science*, 124(1), 144–153.
- Goldberger, R. F., Epstein, C. J., & Anfinsen, C. B. (1963). Acceleration of Reactivation of Reduced Bovine Pancreatic Ribonuclease by a Microsomal System from Rat Liver Acceleration of Reactivation of Reduced Ribonuclease by a Microsomal System Bovine Pancreatic from Rat Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 232(2), 628–635.
- Gottesman, S., Maurizi, M. R., & Wickner, S. (1997). Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell*, 91(4), 435–438.
- Grinnat, S. (1979). Glucosidases which, 254(18), 8814–8818.
- Gundelfinger, E. D., Krause, E., Melli, M., & Dobberstein, B. (1983). Nucleic Acids Research The organization of the 7SL RNA in the signal recognidon particle Nucleic Acids Research, 1(21), 7363–7374.
- Häcki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rossé, T., Fellay, I., & Borner, C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*, 19(19), 2286–2295.
- Hammond, C., & Helenius, A. (2006). Quality control in the secretory pathway. *The Israel Medical Association Journal : IMAJ*, 8(4), 238–242.
- Hampton, R. Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 14(0955–0674), 476–482.
- Hampton, R. Y., Gardner, R. G., & Rine, J. (1996). Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein.

Molecular Biology of the Cell, 7(12), 2029–2044.

- Hansen, W., Garcia, P. D., & Walter, P. (1986). In Vitro Protein Translocation across the Yeast Endoplasmic Reticulum : ATP-Dependent Post- translational Translocation of the Prepro-a-Factor, *45*, 397–406.
- Hao Dong, Mukesh Sharma, Huan-Xiang Zhou, and T. A. C. (2013). Glycines: Role in α -Helical Membrane Protein Structures and a Potential Indicator for Native Conformation. *Biochemistry*, *31*(9), 1713–1723.
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, *397*(6716), 271–274.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*.
- Hatsuzawa, K., Mizushima, S., & Science, L. (1997). The Hydrophobic Recognition and Region Protein of Signal Peptides Is a Determinant for Translocation across the ER Membrane ², *277*, 270–277.
- von Heijne, G. (1985). Signal Sequences The Limits of Variation, 99–105.
- Hu, B. R., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Liu, C. L. (2000). Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(9), 3191–3199.
- Hurtley, S. M., & Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Cell Biology*, *5*, 277–307.
- Hwang, C., Sinskey, A., & Lodish, H. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, *257*(5076), 1496–1502.
- Chamberlain, L. H., & Burgoyne, R. D. (1997). Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine-string protein. *The Biochemical Journal*, *322*, 853–858.
- Cheetham, M. E., & Caplan, A. J. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: Conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress and Chaperones*.
- Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., & Frydman, J. (2011). Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(8), 1–14.
- Chen, X., Eastonb, D., Oh, H. J., Lee-Yoon, D. S., Liu, X., & Subject, J. (1996). The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-, HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*, *380*(1–2), 68–72.
- Jakob, U., & Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends in Biochemical Sciences*, *19*(5), 205–211.
- Jentsch, S., & Rumpf, S. (2007). Cdc48 (p97): a “molecular gearbox” in the ubiquitin pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(1), 6–11.
- Jo, Y., Lee, P. C. W., Sguigna, P. V., & DeBose-Boyd, R. A. (2011). Sterol-induced degradation of HMG CoA reductase depends on interplay of two Insigs and two ubiquitin ligases, gp78 and Trc8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(51), 20503–20508.
- Johnston, J. A., Ward, C. L., & Kopito, R. R. (2012). A Cellular Response to Misfolded Proteins Aggresomes : *Cell*, *143*(7), 1883–1898.
- Kaganovich, D., Kopito, R., & Frydman, J. (2009). Compartments, *454*(7208), 1088–1095.
- Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S. V., Ehrlich, R., & Lederkremer, G. Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(6), 1711–1723.
- Kean, E. L. (1985). Stimulation by dolichol phosphate-mannose and phospholipids of the biosynthesis of N-acetylglucosaminylpyrophosphoryl dolichol. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(23), 12561–12571.
- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Walter, P., & Stroud, R. M. (1998). Crystal Structure of the Signal Sequence Binding Subunit of the Signal Recognition Particle, *94*, 181–191.
- Kim, S., Sideris, D. P., Sevier, C. S., & Kaiser, C. A. (2012). Balanced Ero1 activation and inactivation

- establishes ER redox homeostasis. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 713–725.
- Kim, W., Spear, E. D., & Ng, D. T. W. (2005). Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Molecular Cell*, 19(6), 753–764.
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., ... Iwai, K. (2006). A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO Journal*, 25(20), 4877–4887.
- Kleckner, N., & Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867), 835–837.
- Kopito, R. R. (1997). ER quality control: The cytoplasmic connection. *Cell*, 88(4), 427–430.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B., & Rapoport, T. A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *The EMBO Journal*, 14(2), 217–223.
- Kuwabara, N., Minami, R., Yokota, N., Matsumoto, H., Senda, T., Kawahara, H., & Kato, R. (2015). Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated athanogene 6)-Ubl4a (ubiquitin-like protein 4a) complex reveals a novel binding interface that functions in tail-anchored protein biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(15), 9387–9398.
- Kuznetsov, G., Brostrom, M. A., & Brostrom, C. O. (1992). Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *Journal of Biological Chemistry*, 267(6), 3932–3939.
- LaMantia, M., & Lennarz, W. J. (1993). The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell*, 74(5), 899–908.
- Lane, N., & Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, 467(7318), 929–934.
- Leznicki, P., Clancy, A., Schwappach, B., & High, S. (2010). Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science*, 123(13), 2170–2178.
- Macdermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., & Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069), 519–522.
- Maeshima, H., Okuno, E., Aimi, T., Morinaga, T., & Itoh, T. (2001). An archaeal protein homologous to mammalian SRP54 and bacterial Ffh recognizes a highly conserved region of SRP RNA, 507, 336–340.
- Maillard, A. P., Lalani, S., Silva, F., Belin, D., & Duong, F. (2007). Deregulation of the SecYEG Translocation Channel upon Removal of the Plug Domain *. 282(2), 1281–1287.
- Marius, K. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease.
- Martin, J., & Ulrich Hartl, F. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(1), 41–52.
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., & Nakanishi, S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 349(6312), 760–765.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), 261–263.
- Meyerson, J. R., Kumar, J., Chittori, S., Rao, P., Pierson, J., Bartesaghi, A., ... Subramaniam, S. (2014). Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization HHS Public Access. *Nature*, 514(7522), 328–334.
- Mfiller, G. (1990). MINI-REVIEW Ribonucleoparticle-Independent Transport of Proteins into Mammalian Microsomes, 22(6).
- Mothes, W., Prehn, S., & Rapoport, T. A. (1994). Systematic probing, 13(17), 3973–3982.
- Müller, G., & Zimmermann, R. (1987). Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *The EMBO Journal*, 6(7), 2099–2107. Retrieved from

- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., & Li, E. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, *403*(January), 98–103.
- Nath, A., Vetrovec, G. W., Cowley, M. J., Newton, M., DiSciascio, G., Mukharji, J., & Lewis, S. a. (1988). Glutamate receptor review. *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis*, *14*(1), 37–40.
- Ng, D. T. W., Brown, J. D., & Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology*, *134*(2), 269–278.
- Nguyen, V. D., Wallis, K., Howard, M. J., Haapalainen, A. M., Salo, K. E. H., Saaranen, M. J., ... Williamson, R. A. (2008). Alternative Conformations of the x Region of Human Protein Disulphide-Isomerase Modulate Exposure of the Substrate Binding b' Domain. *Journal of Molecular Biology*, *383*(5), 1144–1155.
- Niciu, M. J., Kelmendi, B., & Sonacora, G. (2013). Overview of Glutermatergic Neurotransmission in Nervous System. *Pharmacol Biochem Behav*, *100*(4), 656–664.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., & Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *The Journal of Cell Biology*, *153*(5), 1011–1022.
- Oka, O. B. V., & Bulleid, N. J. (2013). Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(11), 2425–2429.
- Orlean, P., Albright, C., & Robbins, P. W. (1988). Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(33), 17499–17507.
- Paschen, W., & Mengesdorf, T. (2005). Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium*, *38*(3–4 SPEC. ISS.), 409–415.
- Perry, R. J., & Hodges, J. R. (1999). Attention and executive deficits in Alzheimer ' s disease A critical review, 383–404.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., & Hellen, C. U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmatic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.*, *12*, 67–83.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J., & Rapoport, T. A. (1998). Signal Sequence Recognition in Posttranslational Protein Transport across the Yeast ER Membrane, *94*, 795–807.
- Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., & Pearl, L. H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, *90*(1), 65–75.
- R. Hegde, S. S. (2011). A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell*, *147*(7), 1576–1588.
- Rabu, C., Schmid, V., Schwappach, B., & High, S. (2009). Biogenesis of tail-anchored proteins : the beginning for the end ?
- Rapiejko, P. J., Gilmore, R., Althoff, S. M., Stevens, S. W., Wise, J. A., Andrews, D. W., ... Walter, P. (1997a). Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell*, *89*(5), 703–713.
- Rapiejko, P. J., Gilmore, R., Althoff, S. M., Stevens, S. W., Wise, J. A., Andrews, D. W., ... Walter, P. (1997b). Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell*, *89*(5), 703–713.
- Raymond J. Deshaies, Sylvia L. Sanders, D. A. F. & R. S. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*.
- Room, T. B., Lauderdale, F., & Goldberg, I. J. (2015). A Ribosome-Associating Factor Chaperones Tail-Anchored Membrane Proteins, *12*(2), 130–140.
- Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, *250*(5463), 194–199.

- Ruggiano, A., Foresti, O., & Carvalho, P. (2014). ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *Journal of Cell Biology*, 204(6), 869–879.
- Rutkevich, L. A., & Williams, D. B. (2012). Vitamin K epoxide reductase contributes to protein disulfide formation and redox homeostasis within the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), 2017–2027.
- Sevier, C. S., & Kaiser, C. A. (2008). Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(4), 549–556.
- Shan, S. O., & Walter, P. (2005). Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Letters*, 579(4 SPEC. ISS.), 921–926.
- Schlenstedts, G., Gudmundsson, G. H., Bomans, G., & Zimmermann, R. (1992). Structural Requirements for Transport of PreprocecropinA and Related Presecretory Proteins into Mammalian Microsomes *, 24328–24332.
- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H. D., ... Weissman, J. S. (2008). The GET Complex Mediates Insertion of Tail-Anchored Proteins into the ER Membrane. *Cell*, 134(4), 634–645.
- Schulman, S., Wang, B., Li, W., & Rapoport, T. A. (2010). Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15027–15032.
- Schwartz, T., & Blobel, G. (2003). Structural basis for the function of the β subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell*, 112(6), 793–803.
- Schwarz, F., & Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(5), 576–582.
- Siegel, V., & Walter, P. (1988). Each of the Activities of Signal Recognition Particle (SRP) Is Contained within a Distinct Domain : Analysis of Biochemical Mutants of SRP, 52, 39–49.
- Song, B. L., Sever, N., & DeBose-Boyd, R. A. (2005). Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Molecular Cell*, 19(6), 829–840.
- Spence, J., & Georgopoulos, C. (1989). Purification and properties of the Escherichia coli heat shock protein, HtpG. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(8), 4398–4403. Retrieved from
- Stoller, T. J., & Shields, D. (1989). The propeptide of preprosomatostatin mediates intracellular transport and secretion of α -globin from mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 108(5), 1647–1655.
- Suh, K., Gabel, C. A., & Bergmann, J. E. (1992). Identification of a novel mechanism for the removal of glucose residues from high mannose-type oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21671–21677.
- Suloway, C. J. M., Rome, M. E., & Clemons, W. M. (2012). Tail-anchor targeting by a Get3 tetramer: The structure of an archaeal homologue. *EMBO Journal*, 31(3), 707–719.
- Swanson, R., Locher, M., & Hochstrasser, M. (2001). A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope / endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Mat α 2 repressor degradation. *Genes & Development*, 2(20), 2660–2674.
- Swatek, K. N., & Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, 26(4), 399–422.
- Swiezewska, E., & Danikiewicz, W. (2005). Polyisoprenoids: Structure, biosynthesis and function. *Progress in Lipid Research*, 44(4), 235–258.
- Tavender, T. J., & Bulleid, N. J. (2010). Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H₂O₂ produced during disulphide formation. *Journal of Cell Science*, 123(15), 2672–2679.
- Thomas Ramming and Christian Appenzeller-Herzog. (2012). The Physiological Functions of Mammalian Endoplasmic, 16(10).

- Tirasophon, W., Welihinda, A. A., & Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes and Development*, *12*(12), 1812–1824.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., & Rapoport, T. A. (2001). Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*, *104*(6), 937–948.
- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., & Jansen, G. (2008). Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., and Jansen, G. (2008). ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* *321*, 569–572. Rdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in. *Science*, *321*(July), 569–572.
- Van Den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(3), 151–208.
- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet*, *369*(9557), 218–228.
- Walter, P., & Blobel, G. (1983). Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell*, *34*(2), 525–533.
- Wang, F., Brown, E. C., Mak, G., Zhuang, J., & Denic, V. (2010). A chaperone cascade sorts proteins for posttranslational membrane insertion into the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, *40*(1), 159–171.
- Wang, L., Zhang, L., Niu, Y., Sitia, R., & Wang, C. (2014). Glutathione Peroxidase 7 Utilizes Hydrogen Peroxide Generated by Ero1 α to Promote Oxidative Protein Folding. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*(4), 545–556.
- Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *57*(4), 1041–1048.
- Wang, X.-Y., Kazim, L., Repasky, E. A., & Subjeck, J. R. (2001). Characterization of Heat Shock Protein 110 and Glucose-Regulated Protein 170 as Cancer Vaccines and the Effect of Fever-Range Hyperthermia on Vaccine Activity. *The Journal of Immunology*, *166*(1), 490–497.
- Welti, M. (2013). Regulation of dolichol-linked glycosylation. *Glycoconjugate Journal*, *30*(1), 51–56.
- Wiertz, E. J. H. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H. J., & Ploegh, H. L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, *84*(5), 769–779.
- Wiertz, E. J. H. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., ... Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, *384*(6608), 432–438.
- Wilkinson, B., & Gilbert, H. F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1699*(1–2), 35–44.
- Wilkinson, B. M., Brownsword, J. K., Mousley, C. J., & Stirling, C. J. (2010). Sss1p Is Required to Complete Protein Translocon, *285*(42), 32671–32677.
- Winnefeld, M., Grewenig, A., Schnölzer, M., Spring, H., Knoch, T. A., Gan, E. C., ... Cziepluch, C. (2006). Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest. *Experimental Cell Research*, *312*(13), 2500–2514.
- Wolff, S., Weissman, J. S., & Dillin, A. (2014). Differential scales of protein quality control. *Cell*, *157*(1), 52–64.
- Yamamoto, H., Hagino, Y., Kasai, S., & Ikeda, K. (2015). Specific Roles of NMDA Receptor Subunits in Mental Disorders. *Current Molecular Medicine*, *15*(3), 193–205.
- Yamamoto, Y., & Sakisaka, T. (2015). The emerging role of calcium-modulating cyclophilin ligand in posttranslational insertion of tail-anchored proteins into the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biochemistry*, *157*(6), 419–429.
- Ye, Y., Meyer, H. H., & Rapoport, T. A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins

- from the ER into the cytosol. *Nature*, 414(6864), 652–656.
- 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.
- Zaher, H. S., & Green, R. (2009). Fidelity at the Molecular Level: Lessons from Protein Synthesis. *Cell*, 136(4), 746–762.
- Zettl, M., Adrain, C., Strisovsky, K., Lastun, V., & Freeman, M. (2011). Rhomboid family pseudoproteases use the ER quality control machinery to regulate intercellular signaling. *Cell*, 145(1), 79–91.
- Zhang, X., Kung, S., & Shan, S. (2008). Demonstration of a Multistep Mechanism for Assembly of the SRP·SRP Receptor Complex: Implications for the Catalytic Role of SRP RNA. *Journal of Molecular Biology*, 381(3), 581–593.
- Zhang, X., Schaffitzel, C., Ban, N., & Shan, S. (2009). Multiple conformational switches in a GTPase complex control co-translational protein targeting.
- Zhang, Z. R., Bonifacino, J. S., & Hegde, R. S. (2013). Deubiquitinases sharpen substrate discrimination during membrane protein degradation from the ER. *Cell*, 154(3), 609–622.
- Zimmer, J., Nam, Y., & Rapoport, T. A. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel, 455(October).