



未折叠蛋白响应的激活机制*

王立堃** 李 桃 徐芬芬

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 未折叠蛋白在内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 腔中累积造成 ER 应激, 此时细胞启动未折叠蛋白响应 (unfolded protein response, UPR) 以恢复蛋白质稳态。目前已知有三种 UPR 感受器, 即 IRE1、PERK 和 ATF6, 它们均为 ER 跨膜蛋白, 在 ER 应激时被激活并启动下游 UPR 信号通路。虽然 UPR 感受器最早是在研究细胞如何应对 ER 应激时发现的, 但它们如何感知 ER 应激至今未得到完满的回答。随着研究的深入, 人们发现 UPR 的功能不仅限于维持蛋白质稳态, 而 UPR 感受器也不是只对未折叠蛋白累积作出响应。本文对 UPR 的发现及其经典通路作一介绍, 着重阐述目前已知的 UPR 感受器的激活机制, 并就 UPR 和 ER 应激关系以及该领域存在的问题进行讨论。

关键词 内质网应激, 未折叠蛋白响应, IRE1, PERK, ATF6

中图分类号 Q2, Q5

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0137

真核细胞的内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是分泌蛋白和膜蛋白折叠和翻译后修饰的重要场所。当蛋白质折叠和转运异常时, 大量未折叠和错误折叠蛋白会在 ER 腔累积, 这被称为“ER 应激”。ER 应激发生时, IRE1、PERK 和 ATF6 以不同方式被激活, 启动分子伴侣和折叠酶的表达, 同时调整蛋白质翻译、转运、降解速率, 以恢复 ER 正常功能。这三条通路被称为“未折叠蛋白响应 (unfolded protein response, UPR)”。作为 ER 应激的感受器, IRE1、PERK 和 ATF6 如何感知未折叠蛋白累积这一信号是该领域基本的科学问题。作为 ER 定位的跨膜蛋白, 三者既能对 ER 腔环境改变也能对 ER 膜状态变化作应答。近年来的研究发现, 来自胞质和胞外的信号也能激活 UPR。三条 UPR 通路的存在以及各自特有的激活方式使得 UPR 信号的调控和功能更加多样化。UPR 与细胞多种生理功能密切相关, 也与疾病的发生发展密不可分, 对于生理及生理病理条件下 UPR 激活机制的深入研究有助于进一步理解 UPR 的调控机制和生理意义。这方面还有很多问题亟待解决。

本文对 UPR 的激活机制作一介绍, 将从未折叠蛋白依赖和非依赖的机制分别阐述。对于 UPR 和 ER 应激的关系, 提出对今后需解决问题的看法。

1 UPR

1.1 UPR 的发现及其和 ER 应激的关系

UPR 概念是在研究细胞如何应对 ER 腔未折叠蛋白累积这一问题中提出的。真核细胞中, 分泌蛋白和膜蛋白的折叠和组装在 ER 里进行, ER 腔中高度的氧化环境为蛋白质氧化折叠提供了必要条件^[1]。ER 也是蛋白质 N-连接糖基化的场所, 帮助糖蛋白正确折叠的分子伴侣钙网蛋白 (calreticulin, CALR)、钙联结蛋白 (calnexin, CNX) 都是钙结合蛋白, 它们的活性受 Ca^{2+} 调控^[2]。可以想见, 糖基化受阻, 或是 ER 腔氧化还原水平、钙浓度受干扰会影响 ER 腔内蛋白质的折叠。在 20 世纪 70 年代, 人们发现葡萄糖剥夺能特异性激活一系列基因的表达, 这些基因的蛋白质产物被称为“葡萄糖调控蛋白 (glucose-regulated protein, GRPs)”^[3]。20 世纪 80 年代鉴定到 ER 腔定位的、能够结合免疫球蛋白重链的蛋白质, 将其命名为重链结合蛋白 (binding immunoglobulin protein, BiP), 随即人们

* 国家自然科学基金 (32170785) 和中国科学院青年交叉团队 (JCTD-2021-07) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64881162, E-mail: wanglikun@ibp.ac.cn

收稿日期: 2023-04-10, 接受日期: 2023-04-19

认识到 BiP 就是 GRP 成员中的 GRP78^[4-5]。利用 N-连接糖基化抑制剂衣霉素 (tunicamycin, Tm) 或葡萄糖类似物 2-脱氧葡萄糖 (2-deoxyglucose) 处理细胞, 能上调 BiP 表达。不仅如此, BiP 能与错误折叠蛋白结合, 而在细胞中表达错误折叠蛋白或过表达分泌蛋白也被证实能诱导 GRPs 表达^[6-7]。这些实验现象促使人们将葡萄糖剥夺和蛋白质错误折叠联系起来, 并提出, 细胞具有一种叫“未折叠蛋白响应”即 UPR 的机制, 能对 ER 腔内错误折叠和未折叠蛋白累积这一信号做出响应, 上调 GRPs 的表达。

错误折叠蛋白在 ER 腔累积的现象被称为 ER 应激。利用 Tm 抑制蛋白 N-连接糖基化、利用 ER 膜定位的 Ca^{2+} 泵 SERCA 的抑制剂毒胡萝卜素 (thapsigargin, Tg) 导致 ER 腔 Ca^{2+} 浓度下降, 或是利用小分子还原剂如 β 巯基乙醇或二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 破坏蛋白质二硫键, 都能造成错误折叠蛋白在 ER 腔中累积。这也是常用的诱发 ER 应激的实验手段^[8]。内质网应激下, BiP 的上调是在转录水平进行的。酿酒酵母的 BiP 同源基因 *KAR2* 的启动子区具有一个由 22 个碱基对组成的顺式作用原件, 对于 Tm 处理下 *KAR2* 转录活性上调至关重要, 被称为未折叠蛋白响应原件 (unfolded protein response element, UPRE)^[9-10]。20 世纪 90 年代初期, 以 Walter 和 Mori 为代表的研究者利用 UPRE 驱动表达的报告系统, 在酿酒酵母中进行了一系列遗传筛选工作, 鉴定到迄今已知最为保守的 UPR 通路: Ire1 及其下游转录因子 Hac1^[11-14]。1998 年, 哺乳动物细胞中 Ire1 的同源物 ERN1 (也称为肌醇需求酶 1 α , 即 inositol-requiring enzyme 1, IRE1 α) 和 ERN2 (也称为 IRE1 β) 被发现^[15-16]。2001 年, Hac1 的同源物 XBP1 (X-box-binding protein 1) 被鉴定到^[17]。有意思的是, 在此之前 XBP1 已被发现是转录因子, 调控 B 细胞主要组织相容性复合物 II 类分子的表达^[18]。后生动物中, 除了上述 IRE1 通路外, 还发现另外两条 UPR 通路, 蛋白激酶 RNA 样 ER 激酶 (PKR-like ER kinase, PERK) 和激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)^[19-21]。至此, 目前通常所说的三条 UPR 通路均被鉴定到。

1.2 UPR 信号通路

UPR 信号通路可由 IRE1、PERK 和 ATF6 启动。这 3 种蛋白质均为 ER 定位的一次跨膜蛋白。在哺乳动物中, IRE1 α 全身性表达, 而 IRE1 β 在肠

道和肺上皮细胞中特异性表达, 因此说到 IRE1 通路, 人们也常只提及 IRE1 α 。一般认为, 当 ER 腔内未折叠蛋白和错误折叠蛋白累积时, IRE1、PERK 和 ATF6 接收该信号并通过不同方式将信号传递到细胞质和细胞核, 通过转录水平和翻译水平的调控来帮助蛋白质折叠, 恢复 ER 稳态。但是, 持续激活的 UPR 也可能诱导程序性细胞死亡 (图 1)^[22]。

IRE1 α 由 N 端 ER 腔结构域、跨膜区和 C 端胞质区组成, 其中胞质区包含两个结构域, 分别具有蛋白激酶和 RNA 内切酶活性。IRE1 α 能特异性识别并切割 *XBPI* mRNA, 启动 *XBPI* mRNA 剪接, 移除一段 26 bp 的内含子。这会导致翻译阅读框的移码, 其结果是剪接后 *XBPI* (*XBPIs*, s 指 spliced) 的翻译推迟终止, 产生具有转录因子活性的 *XBPIs* 蛋白^[11-12, 15]。*XBPIs* 通过上调与蛋白质转运、折叠、分泌和降解相关基因的表达, 以应对 ER 应激。IRE1 α 还能降解一些 mRNA 和微小 RNA (microRNA) 前体, 该过程被称为受调控的 IRE1 依赖的降解 (regulated IRE1-dependent decay, RIDD)。RIDD 导致那些附着于 ER 膜胞质侧的 RNA (它们往往是 ER 定位蛋白、分泌蛋白和膜蛋白的 mRNA) 降解, 影响细胞功能, 也可能减轻 ER 蛋白折叠负担^[23-25]。microRNA 前体如 pre-miR17 的降解则被报道和程序性细胞死亡相关^[26-27]。IRE1 α 也能与肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (tumor necrosis factor receptor associated factor 2, TRAF2) 结合, 上调 c-Jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 磷酸化并引起细胞凋亡^[28], 或是促进 NF- κ B 活化, 从而激活炎症因子的产生^[29]。

与 IRE1 α 类似的, PERK 也是 I 型跨膜蛋白, 其 C 端胞质区含激酶结构域。PERK 的激活也伴随着二聚化的发生。PERK 能磷酸化真核翻译起始因子 2 的 α 亚基 (eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, eIF2 α), 抑制蛋白质翻译, 减轻 ER 蛋白质折叠的负担。但是, 一些 5' 非翻译区含有上游开放阅读框 (upstream open reading frame, UORF) 的 mRNA, 此时主要 ORF 的翻译水平反而会增强。转录因子 ATF4 就是典型的在 eIF2 α 磷酸化时翻译上调的蛋白质^[19-20]。一方面, ATF4 能上调参与氨基酸代谢、抗氧化反应及自噬相关基因的转录; 另一方面, ATF4 也能上调 GADD34 表达, 而后者能负反馈抑制 eIF2 α 磷酸化。当 PERK 持续

激活时, ATF4能上调凋亡相关转录因子CHOP和死亡受体DR5的表达, 启动细胞凋亡。此外, PERK还被报道能磷酸化核因子 erythroid 2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2), 后者作为转录因子能促进抗氧化反应相关基因的表达。

ATF6 是 II 型跨膜蛋白。ER 应激发生时, ATF6 从 ER 转移到高尔基体, 并被蛋白酶 S1P 和

S2P 水解, 产生的 N 端片段 (称为 ATF6f) 从高尔基体上脱落, 入核发挥转录因子功能^[30-31]。ATF6f 和 XBP1s 均能结合到 UPR 区, 上调包括 BiP 在内的 UPR 相关基因转录。ATF6f 还能结合到 ER 应激元件 I/II (ER stress element I/II, ERSE-I/II), 上调基因转录^[32]。ATF6f 还能促进 XBP1 和 CHOP 的表达^[17, 33]。对于 ATF6 激活是否也能引起细胞凋亡, 目前还不清楚。

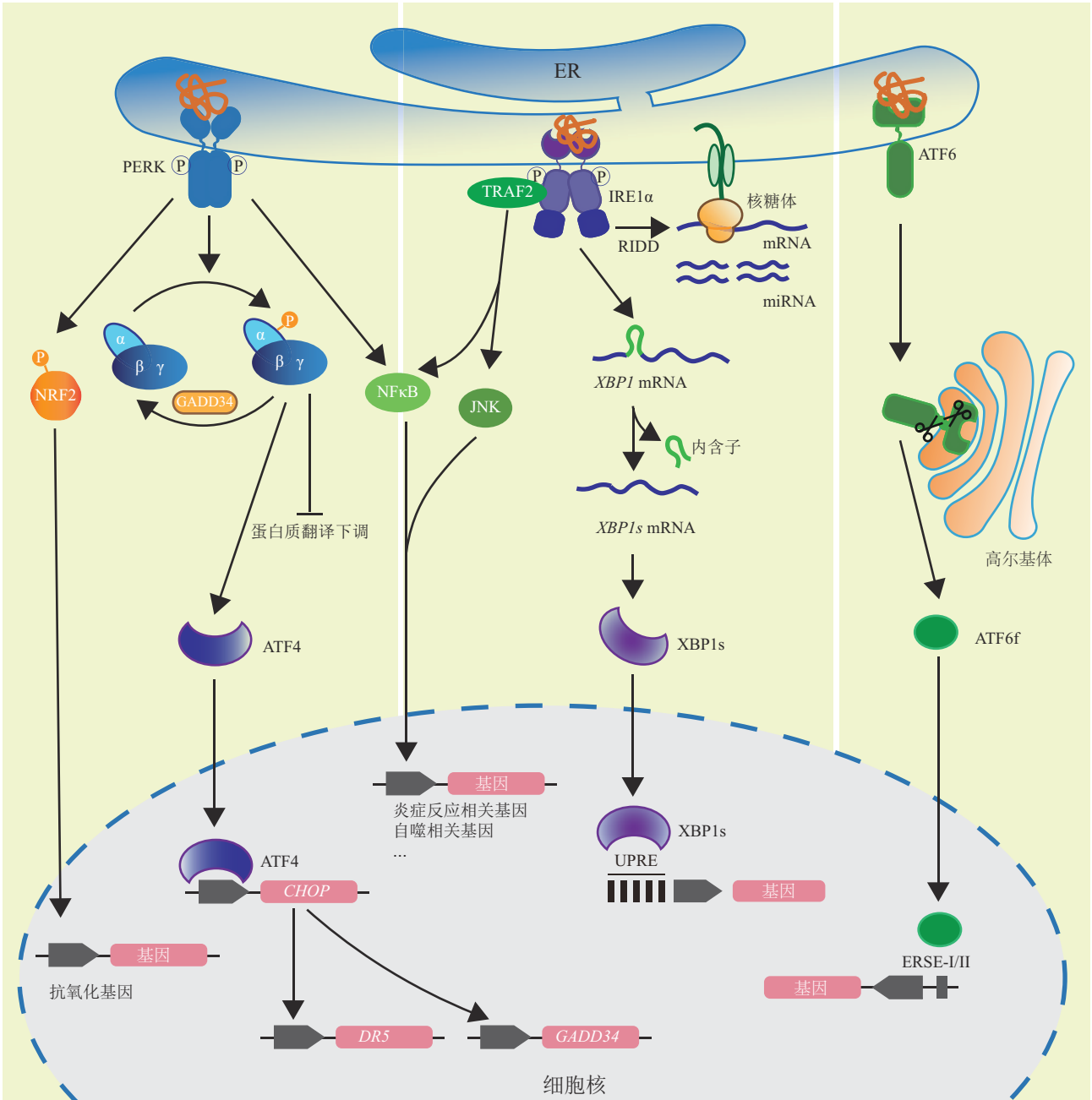


Fig. 1 The unfolded protein response and its downstream signals
图1 UPR通路及其下游信号

需要指出,上述3条UPR通路不是截然分开的。ATF6f和XBP1s激活转录的基因有广泛的交集。它们都能通过上调磷脂酰胆碱的生物合成来增大ER体积,也都能上调ER膜定位的蛋白质转运体SEC61复合物的表达^[34-36]。不同UPR通路间也存在相互调控。比如PERK通路能上调磷酸酶RPAP2的表达,而RPAP2可造成IRE1 α 的去磷酸化^[37]。IRE1 α 能降解DR5 mRNA,也能降解BiP mRNA,因而对三条UPR通路下游信号均有负调控^[24, 38]。此外,XBP1s和ATF6f能形成异源二聚体,激活“ER相关的蛋白质降解(ER-associated protein degradation, ERAD)”相关基因的表达^[39]。这里,ERAD是ER内错误折叠蛋白的降解途径,通过将ER腔内错误折叠蛋白转运到胞浆,再经由泛素-蛋白酶体系统降解^[40]。UPR下游信号非常复杂,影响细胞诸多生理功能,有关UPR功能的更多研究可参考相关综述^[22]。

纵观UPR的发现历程,可以看到它的研究是和ER应激分不开的。直到今天,研究者有时还将UPR和ER应激这一概念等同起来。本文对当前UPR激活机制的研究作一介绍,并试图厘清UPR与ER应激的关系,提出该方向有待解决的问题。

2 聚合状态对IRE1活性的影响

生化和结构研究揭示了IRE1二聚化和寡聚化在其活化中的必要性。带有荧光蛋白标签的IRE1在ER应激时能聚集形成点状,说明胞内IRE1也能发生聚集^[41]。IRE1同源二聚体的形成导致亚基间发生反式自磷酸化^[42]。虽然IRE1 α 激酶结构域磷酸化对其发挥RNA酶活性而言并非必需,但激酶结构域处于“激活”构象是必要的^[43-44]。这可能导致了IRE1 α 的某种构象变化,从而更容易剪切XBP1 mRNA。晶体结构显示,酵母Ire1胞质段以“背靠背”二聚形式存在,C端有一表面富含碱性残基的区域,推测是XBP1 mRNA结合位点^[45-46]。类似的聚合方式在人源IRE1 α 胞质段晶体结构中也被观测到(图2a)^[47]。对人源IRE1 α 胞质段晶体结构的解析还鉴定到另一种“头碰头”的二聚化状态。在“头碰头”结构中,彼此靠近的亚基激酶结构域中活性中心彼此靠近。IRE1 α 磷酸化主要发生在一段称为“活性区(activation segment)”的无规卷曲区,虽然活性区由于柔性太大而难以识别,但从附近肽段走向上可以推测活性区从激酶结构域伸出并靠近邻近亚基激酶结构域的ATP结合口袋(图2b)。这与IRE1 α 的反式自磷酸化相吻合。但

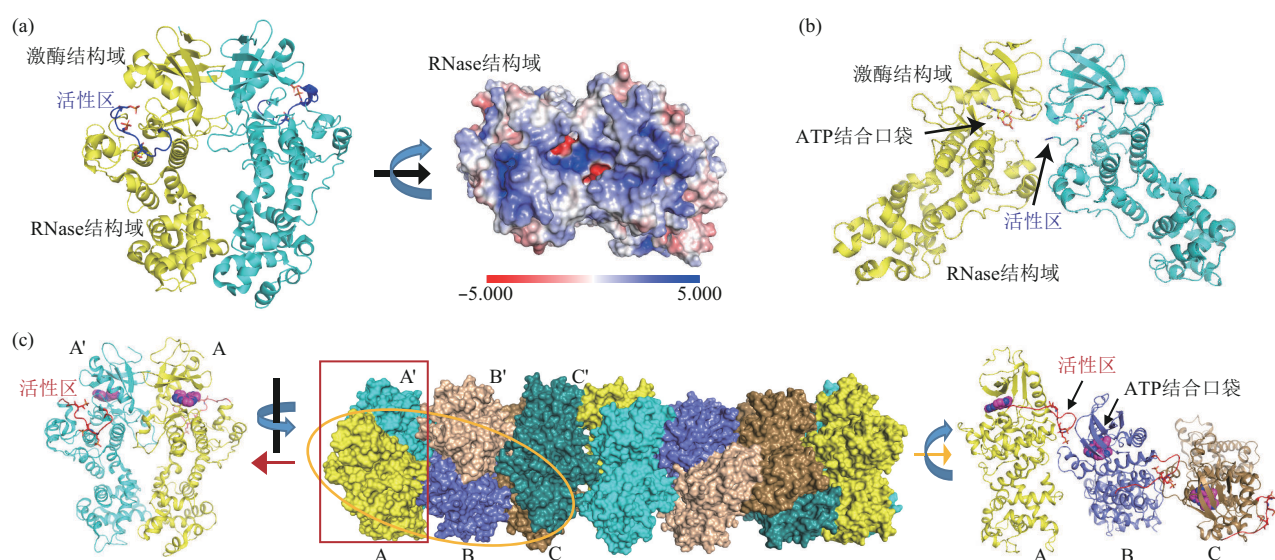


Fig. 2 The crystal structure of the cytosolic part of IRE1

图2 IRE1胞质区晶体结构

(a) 人源IRE1 α 胞质区的“背靠背”同源二聚体结构(PDB ID: 6W3C)。活性区主链用蓝色标示,并显示其上磷酸化位点Ser724/726/729侧链的棍棒图。右侧所示为二聚体表面静电势图,可见C端(底部)有一表面富含正电荷的凹槽。(b) 人源IRE1 α 胞质区的“头碰头”同源二聚体结构(PDB ID: 3P23)。晶体结构中活性区缺失,蓝色标注紧邻缺失部分N端和C端残基。激酶结构域ATP结合口袋中的ADP用棍棒模型显示。(c) 酿酒酵母Ire1胞质区形成螺旋状14聚体(PDB ID: 3FBV)。亚基间用颜色区分。其中6个亚基用字母标注。左侧显示红框部分A和A'亚基形成的“背靠背”二聚体,活性区主链标以红色,ATP结合口袋中的ATP类似物以球状模型显示。右侧显示橙色椭圆部分A、B、C亚基沿螺旋轴向排列,亚基活性区和邻近亚基的ATP结合口袋依次靠近。

是, 在“头碰头”构象中, 亚基的RNase结构域彼此分离, 难以解释其如何结合RNA底物。有可能IRE1 α 以“头碰头”形式发生反式自磷酸后, 再以未知方式转换为“背靠背”模式, 发挥RNase活性^[48]。酵母Ire1胞质段的晶体结构还呈现一种14聚体的螺旋结构, 14聚体内部亚基间以“背靠背”模式结合成二体, 相邻二体间围绕螺旋轴以右手螺旋方式彼此相错51.4°排列(图2c)。突变破坏“背靠背”二体内部亚基间相互作用位点、抑或破坏相邻二体间结合面都能抑制Ire1活性^[49]。我们注意到, 虽然“背靠背”二体内任一亚基的活性区与另一亚基的ATP结合口袋距离很远, 但二体内每个亚基的活性区都与相邻二体中与该亚基相错51.4°的亚基的ATP结合口袋靠近(最近距离大约10 Å), 在14聚体内形成依次衔接模式。考虑到活性区的柔性, 推测这种螺旋状聚集体可能是IRE1既有激酶活性又有RNase活性的形式(图2c)。此外, 晶体结构显示IRE1的ER腔结构域(lumenal domain, LD)也能形成二体^[50-51]。最近利用原位冷冻光电关联显微技术(cryogenic correlated light and electron microscopy combined with electron cryotomography, cryo-CLEM-ET)和免疫电镜技术对细胞内IRE1 α 聚焦点的观察显示, IRE1 α 寡聚体位于具有复杂分支的狭窄管状ER, 且IRE1 α ER腔结构域可能在ER腔内壁附近形成两束相互缠绕的左旋螺旋^[52]。总之, IRE1可能有多种聚合状态。寡聚体的形成对于XBP1剪接是必要的, 但RIDD功能可能主要由二体行使^[53]。

3 来自内质网的UPR激活信号

3.1 ER腔内未折叠蛋白累积

这是最为经典的UPR激活途径。对未折叠蛋白在ER腔中的累积如何被感知并启动UPR, 目前主要有直接结合模型和间接识别模型两种解释(图3)。

直接结合模型认为, IRE1的ER LD能直接与未折叠蛋白结合并被激活(图3)。酿酒酵母Ire1的LD晶体结构显示, Ire1-LD分子间通过反平行 β 折叠片层形成二聚体, 在二聚体顶部有一长而深的富含疏水残基的凹槽, 结构上类似于MHC-I, 推测能结合多肽^[50]。体外实验证实, Ire1-LD能与富含碱性和疏水残基的多肽结合, 凹槽底部Trp426突变为Ala则会削弱蛋白质与多肽相互作用^[54]。人源IRE1 α -LD晶体结构显示与酵母Ire1-LD相似的、

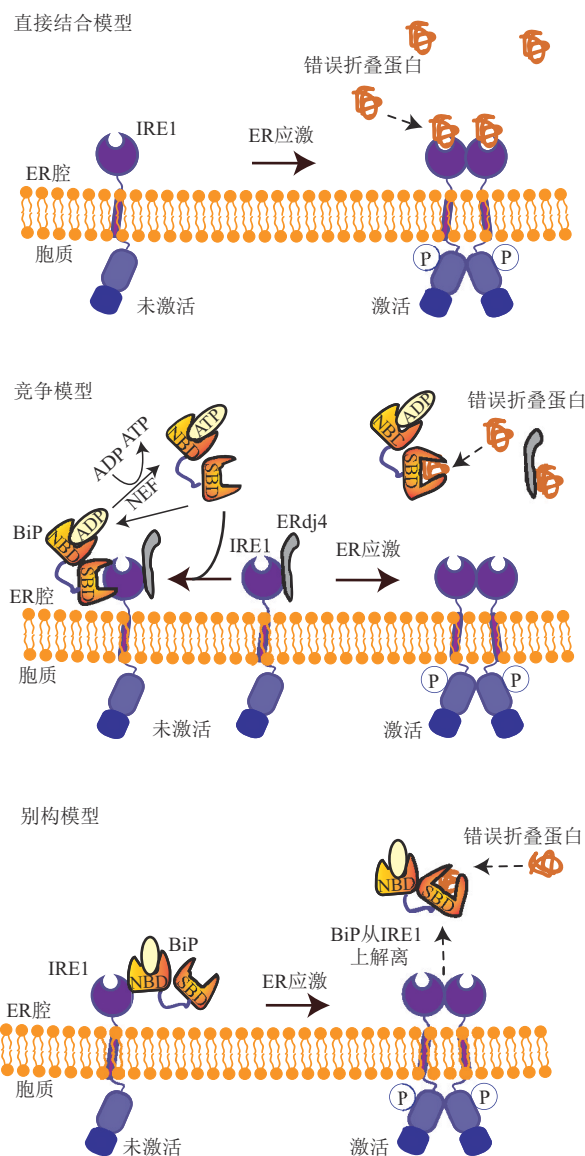


Fig. 3 The direct association model, competition model, and allosteric model of IRE1 α activation under ER stress

图3 ER应激下, IRE1 α 激活的直接结合模型、竞争模型和别构模型

反平行 β 折叠片层介导的二聚化, 突变破坏二聚化位点能降低IRE1 α 活性(图4a)。虽然IRE1 α -LD也有一MHC样疏水凹槽, 但尺寸太小, 不能允许多肽的结合, 这对直接结合模型提出了挑战(图4b)^[51]。然而, 体外实验表明, IRE1 α -LD也能结合多肽, 且这种结合能促进IRE1 α -LD寡聚化^[55]。IRE1激活的直接结合模型仍需更多生化证据支持。

直接结合模型在PERK上也得到了生化和结构生物学实验结果的支持。研究者通过噬菌体展示技术筛选到能和牛源PERK的LD结合的12肽, 结晶

并解析了PERK-LD与该多肽复合物晶体结构。结构显示PERK-LD形成四聚体,其中三个亚基通过一序列保守的凹槽结合12肽,另一个没有结合(图4c)。通过比较结合和没有结合12肽的亚基结构,发现12肽诱导结合位点形成 β 折叠片,在没有结合12肽的亚基中,这部分由于构象不稳定而在晶体结构中难于被辨认,研究者推测12肽的结合能稳定该部分构象,而PERK-LD结合多肽的部位有很大柔性,便于识别和结合具有不同结构的底物蛋白。不仅如此,由于结合12肽而新产生的 β 折叠片还与位于附近另一个不对称单元的亚基中的 β 折叠片形成 β 片层结构,暗示底物蛋白的直接结合能促进PERK寡聚体形成,而这对于PERK激酶活性的发挥有促进作用(图4c)^[56]。

间接识别模型中,IRE1、PERK、ATF6在非激活状态下与BiP结合。当ER腔出现大量未折叠蛋白时,BiP从IRE1和PERK的LD区解离,导致

IRE1和PERK寡聚化(图3)。BiP的解离是可逆的,这保证了UPR活化程度的可调控性。在细胞中过表达BiP能抑制IRE1和PERK的活性^[57]。BiP结合位点被破坏的IRE1 α 突变体在没有ER应激的情况下也表现出部分活性^[58]。以上结果均说明BiP的解离能促进IRE1和PERK活化,但是BiP解离后IRE1和PERK的活化是否仍然需要未折叠蛋白的直接结合尚不清楚。另一方面,对酿酒酵母Ire1的研究则得出不同的结果,丧失BiP的结合位点的Ire1没有表现出更强的对ER应激的反应能力,但对乙醇和高温应激更敏感^[59]。一种折中的解释是,BiP从Ire1上解离并非Ire1激活的直接原因,但BiP结合Ire1能促进Ire1寡聚体的解聚,从而导致Ire1信号衰减^[60]。BiP从ATF6上解离也可能是ATF6转移到高尔基体从而被激活的直接诱因,但这只是推测,没有实验证据^[61]。

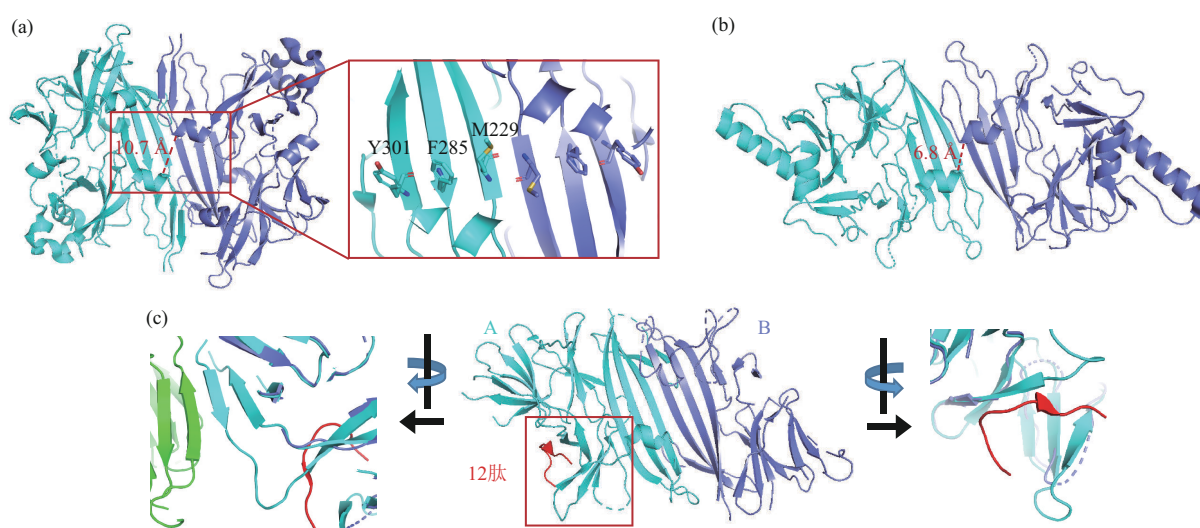


Fig. 4 The crystal structure of the luminal domain (LD) of IRE1 and PERK

图4 IRE1和PERK ER腔结构域 (LD) 晶体结构

(a) 酿酒酵母Ire1p-LD形成同源二聚体 (PDB ID: 2BE1)。右侧显示二聚体中部疏水凹槽及其底部保守疏水残基。(b) 人源IRE1 α -LD形成同源二聚体 (PDB ID: 2HZ6)。注意二聚体中部疏水凹槽比Ire1p-LD中的狭窄。(c) 人源PERK-LD晶体结构 (PDB ID: 5V1D)。仅显示四聚体中两个亚基及其中一个亚基附近结合的12肽 (红色)。右侧,红框部分放大图,显示B亚基 (蓝色) 叠加到A亚基 (天青色) 上的结构差异。左侧,红框部分放大图,显示B亚基叠加到A亚基上,以及A亚基与相邻不对称单元中亚基 (绿色) 间形成 β 片层结构。

BiP属于Hsp70家族,含有核苷酸结合结构域 (nucleotide-binding domain, NBD) 和底物结合结构域 (substrate-binding domain, SBD)。和其他Hsp70家族成员一样,BiP与底物蛋白的结合是受NBD调控的:当NBD和ADP结合时,SBD采取“关闭”构象并与底物蛋白形成牢固复合物;在核

苷酸交换因子 (nucleotide exchange factor, NEF) 帮助下,ADP从NBD解离并被ATP取代,此时SBD成为“打开”状态,底物蛋白释放。一种观点认为,BiP与IRE1结合也是通过SBD,BiP-IRE1结合实际上就是分子伴侣-底物蛋白的结合,这样未折叠蛋白和IRE1在结合BiP这一点上是直接竞

争关系, 这被称为间接识别模型中的竞争模型 (competition model)。在该模型中, ERdj4 作为 BiP 的协同分子伴侣 (co-chaperone) 与 IRE1 的 LD 结合并招募 BiP, 后者与 IRE1 结合并使 IRE1 处于失活状态。ERdj4 也能结合 ER 腔未折叠蛋白并将其呈递给 BiP, 因此, ER 腔中未折叠蛋白会竞争性结合 ERdj4 和 BiP, 削弱它们对 IRE1 的抑制作用, 导致 IRE1 活化^[62]。需要指出, BiP 从 IRE1 上解离是 ATP-NBD 的结合驱动的, 而非未折叠蛋白与 SBD 结合所致, 未折叠蛋白只是与 IRE1 竞争性结合那些尚未结合到 IRE1 上的 BiP。别构模型 (allosteric model) 是另一种类型的间接识别模型^[63]。在别构模型中, BiP 的 NBD 结构域与 IRE1 结合, 其 SBD 与未折叠蛋白的结合导致其构象改变, 从而从 IRE1 上解离 (图 3)。目前, 有关间接识别模型的研究仍主要集中在 IRE1 上, 上述模型是否适用于 PERK 和 ATF6 仍有待验证。

3.2 ER腔定位的UPR活性调控因子

可以看出, 间接识别模型中很重要的一点是 BiP 对 IRE1、PERK 和 ATF6 这三种 UPR 感受器的抑制。近年来的研究发现了一些 ER 腔定位的负调控 IRE1 活性的蛋白质, 在 IRE1 激活程度的精细调控上发挥重要作用。其中, 蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 家族成员 PDIA1 和 PDIA6 均被报道能抑制 IRE1 活性。PDIA1 在被蛋白激酶 Fam20C 磷酸化后能与 IRE1 LD 非共价结合, 而 PDIA6 则与 IRE1 LD 的 Cys148 形成二硫键^[64-66]。Fam20C 是分泌型激酶, 其在 ER 腔滞留可能是 ER 应激的信号; PDIA6 与 IRE1 的共价结合则可能是对 ER 腔氧化还原状态的某种反映。MANF 是一种内质网应激下表达上调的分泌蛋白, 也具有 ER 腔定位, 可以帮助细胞缓解内质网应激。研究发现 MANF 在持续的 ER 应激下能结合 IRE1, 防止其过度激活^[67]。ERP47 是一种 ER 腔定位的分子伴侣。与上述分子不同, ERP47 能与 BiP 竞争结合 IRE1, 且 ERP47 的结合能激活 IRE1^[68]。ER 腔定位的 UPR 感受器调控因子究竟有多少, 它们是否以及如何将 ER 内蛋白折叠状态的信号传递给 UPR 感受器, 有待进一步发现和研究。

3.3 ER膜

不难想到, ER 膜状态改变能调控 ER 膜蛋白的构象和功能。作为 ER 定位的跨膜蛋白, IRE1、

PERK 和 ATF6 三个 UPR 感受器均能在 ER 膜脂饱和度增加的情况下被激活。研究发现, 当用棕榈酸 (一种长链饱和脂肪酸) 处理细胞和抑制酯酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearoyl CoA desaturase 1, SCD1) 时, ER 膜脂饱和度增加, 此时 IRE1 α 和 PERK 通路被激活, 且激活不依赖于两者 LD 的存在, 因而与 ER 腔内蛋白质错误折叠与否无关^[69-70]。对 IRE1 的进一步研究发现, 其跨膜螺旋的 N 端有一两亲性螺旋, 对于感知这种膜状态的变化至关重要。分子动力学模拟显示, 跨膜区以一种斜插的方式穿过脂质双分子层, 而其 N 端的两亲性使得这部分附着在 ER 膜面向 ER 腔一侧的表面, 这种与脂质结合的方式会在其附近压缩膜厚度, 使整个系统处于一种高能不稳定状态。跨膜螺旋彼此靠近能缩小这种高能微区, 从而释放能量使系统更稳定。脂酰链饱和度的增加及固醇比例的增加使得磷脂双分子层厚度增加且脂质分子排布更有序, 此时跨膜螺旋彼此结合能释放更多能量, 热力学上讲是更容易发生的。这可以解释为什么 ER 膜脂饱和度增加能促进 IRE1 寡聚化 (图 5a)^[71]。另一项研究提出了不同的解释, 认为位于跨膜区中部、完全埋藏在脂质双分子层内部的一个色氨酸残基对于 IRE1 聚集是重要的, 这可以用色氨酸侧链的两亲性解释。将此残基突变为苯丙氨酸残基就足以破坏 IRE1 对膜脂饱和度增加的感应 (图 5b)^[72]。对于 PERK 如何感知并响应 ER 膜的改变目前尚未见报道。ATF6 的跨膜区能感知 ER 膜上特定鞘脂二氢鞘氨醇和二氢神经酰胺的存在而被激活, 但二氢鞘氨醇和二氢神经酰胺并不激活 IRE1 和 PERK (图 5c)^[30]。

研究者用“脂双层应激 (lipid bilayer stress, LBS)”来命名由于 ER 膜脂成分和膜物理性质的变化造成的细胞应激, 以区别于 ER 应激。ER 应激下 IRE1 能形成光学显微镜下可见的聚集斑点 (puncta), 但对酿酒酵母 Ire1 的研究发现, LBS 不会造成 IRE1 聚集斑点形成, 所引起的转录组变化也不同于 ER 应激下转录水平改变^[73]。LBS 是否使 IRE1 处于一种和 ER 应激下不同的激活构象并启动特异的下游信号通路, 还需要进一步研究。此外, ER 通道 Sec61 复合物和 ER 跨膜蛋白 EI24 也被报道能结合并阻止 IRE1 的激活^[74-75]。LBS 是否影响上述蛋白质和 IRE1 的相互作用仍有待回答。

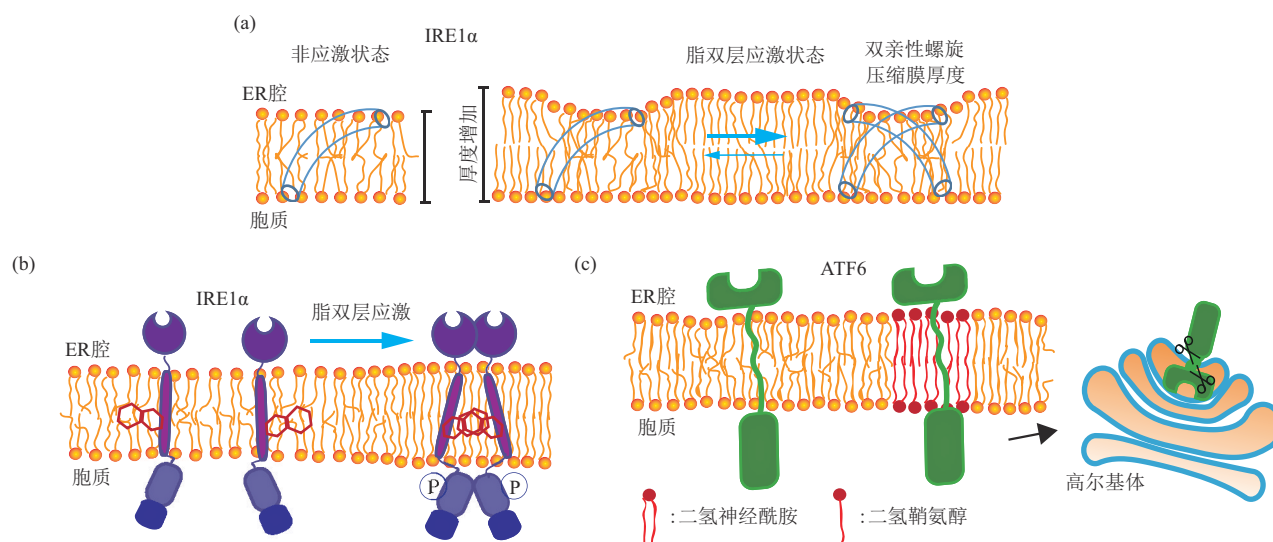


Fig. 5 The activation of IRE1 α and ATF6 under lipid bilayer stress (LBS)

图5 脂双层应激 (LBS) 下IRE1 α 和ATF6的激活

(a) IRE1 α 跨膜区附近的双亲性螺旋促进LBS下的IRE1 α 聚集。(b) IRE1 α 跨膜区中部的色氨酸残基在LBS下促进IRE1 α 聚集。(c) ATF6的跨膜区感受特定脂质造成ATF6向高尔基体转移。

4 来自胞质的UPR激活信号

4.1 UPR感受器结合蛋白

迄今已有不少关于UPR感受器-胞质蛋白相互作用的报道。这些蛋白质-蛋白质相互作用使得三条UPR通路的调控具有更好的特异性和灵活性。这方面的研究目前仍主要集中于IRE1。需要指出，胞质蛋白对UPR感受器的调控是多方面的，这里仅对促进UPR活化的蛋白质做介绍。

Bcl-2家族是细胞凋亡信号途径中关键的凋亡调节因子。前面讲到，IRE1的持续或过度激活能造成程序性细胞死亡。Bcl-2家族成员BAX和BAC能与IRE1 α 胞质区相互作用并增强IRE1活性^[76]，BIM和PUMA则在IRE1下游XBP1信号的持续激活和RIDD发生中扮演重要角色^[77]。非肌肉性肌球蛋白重链IIB (nonmuscle myosin heavy chain IIB, NMHCIIIB) 能特异结合IRE1 α 并帮助IRE1 α 聚集体形成^[78]。因此，细胞骨架蛋白对UPR感受器聚合状态的调控可能是UPR激活的一种新方式。类似的，酪氨酸蛋白激酶ABL1也能结合IRE1胞质区并造成IRE1的寡聚化，这一功能不需要ABL1激酶活性^[79]。在上述例子中，NMHCIIIB和ABL1很可能起到支架蛋白的作用，辅助和促进IRE1寡聚体形成。

UPR感受器的翻译后修饰是另一种激活UPR

的手段。蛋白激酶A (protein kinase A, PKA) 是胞质定位的蛋白激酶，在糖脂代谢中发挥重要作用。PKA能直接磷酸化位于IRE1 α 活性区的Ser724，这是IRE1 α 上高度保守的磷酸化位点。PKA是除IRE1外第一个报道的磷酸化IRE1 α 的激酶，其对IRE1 α 的磷酸化在胰高血糖素信号途径中扮演重要角色^[80]。E3泛素连接酶CHIP (carboxyl terminus of HSC70-interacting protein) 能催化IRE1 α 的泛素化，其中一个泛素化位点Lys545突变为精氨酸残基后会下调IRE1 α 的磷酸化。CHIP催化的IRE1 α 泛素化对IRE1 α 下游XBP1信号没有影响，但是能增强IRE1 α -TRAF2互作及其下游JNK磷酸化^[81]。这种特异激活IRE1 α 激酶结构域、但不影响RNase活性的激活特点是目前已知的、来自ER的UPR激活信号所不具备的。此外，多腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) 催化多个ADP-核糖分子转移至靶蛋白的翻译后修饰，研究发现PARP16能聚ADP-核糖基化IRE1 α 和PERK，但不会修饰ATF6。在没有ER应激的情况下，该修饰也能导致IRE1 α 和PERK的激活^[82]。PARP16是ER跨膜蛋白，其酶活结构域位于胞质，可见这种修饰发生在胞质侧；但PARP16的C端位于ER腔部分对于其激活IRE1和PERK也是必需的。在用Tm诱导ER应激发生的前提下，PARP16能减少IRE1 α 和PERK与BiP互作，因此

PARP16的ER腔段和胞质段对IRE1 α 和PERK的激活均有作用^[82]。

判断一个蛋白质激活UPR是否需要ER腔内未折叠蛋白信号为前提的标准是, 该蛋白质是否能激活缺失LD的UPR感受器。遗憾的是, 这方面的研究非常少, 主要障碍在于过表达的、缺失LD的IRE1和PERK能自发激活。如果通过基因编辑技术直接改造内源基因, 对于回答这一问题将有很大帮助。

4.2 Ca²⁺离子

ER是细胞内的“钙库”, 其腔内Ca²⁺浓度上千倍于胞浆中Ca²⁺浓度, ER膜定位的钙泵SERCA和钙通道蛋白IP3R、RyR等能调控ER内外Ca²⁺浓度, 影响ER稳态和细胞生命活动。破坏ER的Ca²⁺稳态是常用的ER应激诱导方式之一, 但是对于这究竟如何激活UPR, 目前并不清楚。最直接的可能是ER腔依赖的蛋白质折叠受阻, 导致未折叠蛋白和错误折叠蛋白的大量累积。值得注意的是, 近期的研究发现, 胞质Ca²⁺浓度上升也可能是PERK活化的直接因素。SERCA活性受抑制时, 胞质Ca²⁺浓度的升高能迅速上调PERK磷酸化水平, 甚至对于缺失LD的PERK也是如此^[83]。进一步研究揭示, Ca²⁺能直接结合并稳定PERK胞质段, 但Ca²⁺对PERK磷酸化的促进仍然需要Mg²⁺, 后者是激酶辅因子^[84]。Ca²⁺究竟以何种方式结合PERK, 又是如何调控PERK构象变化, 还需要进一步研究。

5 来自胞外的UPR激活信号

5.1 细胞膜受体介导的UPR激活

生理水平UPR的激活不局限于单个细胞, 来自胞外的信号也能激活UPR。Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)在感知病原入侵和激活免疫应答中发挥着重要作用。巨噬细胞的TLR通路能特异性激活IRE1 α 及其下游XBP1 mRNA剪接, 进而促进细胞因子产生^[85-86]。TLR4和TLR2通过诱导NADPH氧化酶2(NOX2)的表达来激活IRE1 α , 但具体分子机制未知^[85]。另一项研究显示, 肿瘤坏死因子受体关联因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)在TLR介导的IRE1 α 活化中起重要作用, TRAF6造成IRE1 α 泛素化, 而这抑制了IRE1 α 与催化其去磷酸化的磷酸酶PP2A的相互作用, 导致IRE1 α 活性上升^[86]。XBP1是在研究B细胞抗原呈递时发现的^[18]。考虑到IRE1 α -XBP1通路在免疫反应中的重要性, 其处

于TLR信号下游并不奇怪。TLR信号激活IRE1 α -XBP1还能上调前列腺素2(prostaglandin H2, PGH2)的生物合成, 在小鼠的痛觉反应中发挥重要功能^[87]。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可在体内诱导血管新生。VEGF能快速激活人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中IRE1 α 、PERK和ATF6三条UPR通路, 体内实验表明UPR的激活对于血管新生至关重要。机制研究发现, VEGF是通过激活PLC γ 、进而激活mTORC1来促进UPR活化的。虽然没有明确的证据, 但推测VEGF受体参与了VEGF-PLC γ -mTORC1-UPR信号传递^[88]。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子家族成员之一, 在神经元的分化、成长与重塑中起重要作用。BDNF能在神经元中特异性激活IRE1 α -XBP1信号通路^[89]。和IRE1 α 在对胰高血糖素信号应答中一样, BDNF也是通过促进PKA对IRE1 α 的磷酸化实现的^[90]。推测BDNF的受体原肌球蛋白相关激酶B(tropomyosin-related kinase B, TrkB)在BDNF激活IRE1 α 的过程中起作用。

5.2 细胞非自主的UPR

细胞非自主的UPR是近年来提出的一个概念, 指细胞将ER应激信号以某种方式传递到其他细胞并在信号接收细胞中激活的UPR。这一现象已在不同类型细胞、组织和器官中被观察到, 包括秀丽线虫的神经细胞-肠道细胞、小鼠下丘脑POMC神经元-肝脏细胞、肿瘤细胞-肿瘤细胞、肿瘤细胞-免疫细胞、心肌细胞-巨噬细胞、肝细胞-肝细胞、肌细胞-肌细胞等^[91-102]。其中一些研究鉴定到供体细胞的IRE1 α -XBP1信号是产生细胞非自主UPR的必要条件, 但这是否适用于所有情况还有待检验^[93-94, 98]。对于跨细胞信号传递方式, 有研究认为分泌因子以小细胞外囊泡(small extracellular vesicle, sEV)形式传递, 比如在肌细胞和肌细胞间的传递^[102]。也有报道称肝细胞-肝细胞之间是通过细胞间连接传递信号的^[99]。但更多的研究中并未对该问题作出清晰的回答。

哪些分子的跨细胞传递导致细胞非自主UPR的发生? 在秀丽线虫中, 神经细胞分泌的酪胺能激活肠道细胞IRE1-XBP1通路^[98]。棕榈酸刺激导致ER应激发生的肌细胞则通过传递神经酰胺到下游肌细胞, 激活下游细胞IRE1 α -XBP1通路^[102]。在

肝细胞癌中,发生ER应激的癌细胞通过上调高尔基蛋白73 (Golgi protein 73, GP73) 的分泌,激活肿瘤浸润的巨噬细胞UPR^[97]。

从以上例子可以看出,细胞非自主UPR可能没有统一的激活机制,而是存在细胞和组织特异性。在不同的ER应激条件下,细胞也可能以不同的方式启动UPR信号的跨细胞传递。该领域还有很多问题有待深入研究。

5.3 其他环境因素

UPR与肿瘤的发生发展密切相关,大量研究报道肿瘤细胞中存在UPR的激活。肿瘤细胞自身的基因突变是UPR活化的原因之一,肿瘤细胞所处环境的特殊性也可能在UPR激活中起重要作用。缺氧是肿瘤微环境的特征之一,细胞培养中低氧应激能导致UPR,但这往往需要很低的氧分压(1%或更低),在接近生理病理条件(1%~5% O₂)条件下UPR只有微弱的激活。缺氧干扰了蛋白质的氧化折叠,造成ER应激;氧气对于脂质去饱和化也是必需的,脂质饱和度增加会影响ER体积的扩张,不利于ER应激的缓解,此外也会造成LBS^[71, 103]。缺氧导致IRE1-XBP1信号通路激活,研究发现XBP1可以与缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducing factor 1 α , HIF1 α) 结合,共同促进HIF1 α 靶基因的转录^[104]。缺氧会下调蛋白质翻译,这对于肿瘤细胞而言是一种保护措施,PERK的缺失不利于翻译水平的下降^[105]。缺氧也会造成细胞活性氧水平上升,干扰蛋白质糖基化^[106]。PERK可以诱导谷胱甘肽合成,从而降低缺氧应激下细胞活性氧水平^[107]。

酸性环境是另一种造成UPR的因素。肿瘤细胞糖酵解产生乳酸造成pH值下降,乳酸和低氧共同刺激下肿瘤细胞XBP1、CHOP和ATF3表达上升^[108]。在内皮细胞中,微酸性环境(pH 6.4)能导致eIF2 α 和IRE1 α 磷酸化,上调ATF3、ATF6f和XBP1 mRNA剪接水平^[109]。质子感应G蛋白偶联受体GPR4和GPR68在酸性激活UPR中起作用^[109-110]。

葡萄糖缺乏和过多也被报道能激活UPR。葡萄糖缺乏影响蛋白质糖基化,可以造成ER应激^[111]。葡萄糖缺乏影响胰岛 β 细胞的SERCA活性,干扰ER腔Ca²⁺稳态,促进PERK和eIF2 α 磷酸化^[112]。高糖刺激也能激活 β 细胞IRE1 α 通路,但具体机制尚不清楚^[88]。代谢相关疾病如糖尿病、肥胖等,往往伴随着UPR信号上调,这是否能归

结于高糖高脂刺激还有待研究。

UPR与很多疾病密切相关,在癌症、代谢性疾病、神经退行性疾病中均有UPR通路激活的报道^[113]。以上举例说明肿瘤和代谢疾病中环境因素导致UPR激活。需要指出,生理和生理病理条件下UPR的研究更多关注其生理意义,忽视了对UPR激活机制的细致探究。复杂环境下UPR的激活很可能是多种因素综合作用的结果。

6 讨论和展望

迄今为止,IRE1是了解最多的UPR感受器,也是已知的唯一能切割XBP1 mRNA、启动XBP1 mRNA剪接的蛋白质。已知的PERK和ATF6下游信号则并非仅位于这两个UPR感受器下游。尤其需要注意的是,PERK-eIF2 α 通路属于整合应激响应(integrated stress response, ISR)的一支,ISR还包括另外3条通路:PKR、GCN2和HRI。在氨基酸缺乏、线粒体应激、氧化应激等条件下,ISR通路的激活均可引起eIF2 α 磷酸化,继而上调ATF4、CHOP的表达(图6)^[114]。一些研究将上述ISR下游信号归结于PERK激活,但并没有验证PERK磷酸化水平是否上升,这有可能得出错误的结论。

UPR和疾病密切相关,但对生理病理条件下UPR激活机制的研究很困难,这一方面是因为这些条件下UPR激活很可能是多种因素综合作用所致,另一方面也因为研究者更关注UPR激活的生理意义。事实上,对UPR生理功能的认识很多来自UPR感受器基因敲除实验,缺乏严格的实验说明,在野生型细胞或个体中相同的生理条件下UPR感受器确实被激活。

UPR与未折叠蛋白的关系是另一个值得关注的问题。虽然最初的UPR概念是指细胞对ER内未折叠蛋白累积这一信号的应答,但越来越多的研究发现,UPR也能以不依赖于未折叠蛋白的方式被激活。厘清UPR激活与未折叠蛋白累积间的关系,对于深入理解UPR激活机制至关重要。然而,目前缺乏实用的检测ER腔内未折叠蛋白和错误折叠蛋白的工具。硫黄素T(thioflavin T, ThT)染料与蛋白质聚集体结合后荧光信号增强,被用于检测蛋白质聚集体,但该染料更适用于检测淀粉样沉淀^[115-117]。有研究表明,ThT能用于检测ER内未折叠蛋白聚集,其实用性尚需更多的实验检验^[117]。近期报道一种ER腔定位的Halo蛋白突变体

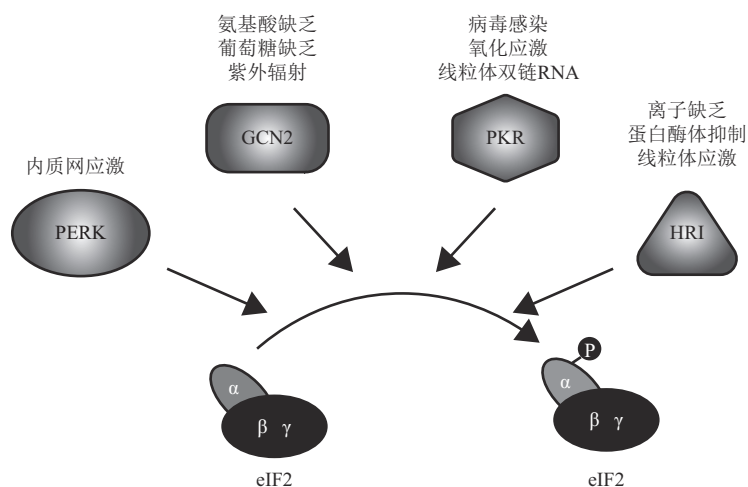


Fig. 6 The four signal pathways of the integrated stress response

图6 整合应激响应的四条信号通路

(AgHalo (ER)), 这种突变体容易发生错误折叠和聚集, 同时能被小分子荧光探针标记, 因而可用于指示ER蛋白质稳态^[64, 118]。但AgHalo (ER) 只对热应激有反应, 且长时间表达会自发聚集, 限制了其应用^[118]。开发更好的检测ER腔内蛋白质稳态的工具对于推进UPR 机制研究很有必要。

参 考 文 献

- [1] Hudson D A, Gannon S A, Thorpe C. Oxidative protein folding: from thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med*, 2015, **80**: 171-182
- [2] Coe H, Michalak M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys*, 2009, **28 Spec No Focus**: F96-F103
- [3] Shiu R P, Pouyssegur J, Pastan I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(9): 3840-3844
- [4] Haas I G, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, 1983, **306**(5941): 387-389
- [5] Munro S, Pelham H R. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 1986, **46**(2): 291-300
- [6] Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, *et al*. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 1988, **332**(6163): 462-464
- [7] Dorner A J, Wasley L C, Kaufman R J. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 1989, **264**(34): 20602-20607
- [8] Almanza A, Carlesso A, Chintia C, *et al*. Endoplasmic reticulum

stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*, 2019, **286**(2): 241-278

- [9] Mori K, Sant A, Kohno K, *et al*. A 22 bp *cis*-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J*, 1992, **11**(7): 2583-2593
- [10] Kohno K, Normington K, Sambrook J, *et al*. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*, 1993, **13**(2): 877-890
- [11] Cox J S, Shamu C E, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 1993, **73**(6): 1197-1206
- [12] Mori K, Ma W, Gething M J, *et al*. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*, 1993, **74**(4): 743-756
- [13] Cox J S, Walter P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 1996, **87**(3): 391-404
- [14] Mori K, Kawahara T, Yoshida H, *et al*. Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells*, 1996, **1**(9): 803-817
- [15] Tirasophon W, Welihinda A A, Kaufman R J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*, 1998, **12**(12): 1812-1824
- [16] Wang X Z, Harding H P, Zhang Y, *et al*. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*, 1998, **17**(19): 5708-5717
- [17] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, *et al*. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001, **107**(7): 881-891
- [18] Liou H C, Boothby M R, Finn P W, *et al*. A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha

- promoter. *Science*, 1990, **247**(4950): 1581-1584
- [19] Harding H P, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 1999, **397**(6716): 271-274
- [20] Shi Y, Vatter K M, Sood R, *et al.* Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(12): 7499-7509
- [21] Yoshida H, Haze K, Yanagi H, *et al.* Identification of the *cis*-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*, 1998, **273**(50): 33741-33749
- [22] Hetz C, Zhang K, Kaufman R J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, **21**(8): 421-438
- [23] Hollien J, Weissman J S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, 2006, **313**(5783): 104-107
- [24] Han D, Lerner A G, Vande Walle L, *et al.* IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*, 2009, **138**(3): 562-575
- [25] Maurel M, Chevet E, Tavernier J, *et al.* Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*, 2014, **39**(5): 245-254
- [26] Upton J P, Wang L, Han D, *et al.* IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*, 2012, **338**(6108): 818-822
- [27] Lerner A G, Upton J P, Praveen P V, *et al.* IRE1alpha induces Thioredoxin-Interacting Protein to activate the NLRP3 Inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER Stress. *Cell Metab*, 2012, **16**(2): 250-264
- [28] Urano F, Wang X, Bertolotti A, *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 2000, **287**(5453): 664-666
- [29] Tam A B, Mercado E L, Hoffmann A, *et al.* ER stress activates NF-kappaB by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e45078
- [30] Tam A B, Roberts L S, Chandra V, *et al.* The UPR activator ATF6 responds to proteotoxic and lipotoxic stress by distinct mechanisms. *Dev Cell*, 2018, **46**(3): 327-343.e327
- [31] Vatter K M, Wek R C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(31): 11269-11274
- [32] Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, *et al.* Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive *cis*-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem*, 2004, **136**(3): 343-350
- [33] Ye J. Transcription factors activated through RIP (regulated intramembrane proteolysis) and RAT (regulated alternative translocation). *J Biol Chem*, 2020, **295**(30): 10271-10280
- [34] Adamson B, Norman T M, Jost M, *et al.* A multiplexed single-cell CRISPR screening platform enables systematic dissection of the unfolded protein response. *Cell*, 2016, **167**(7): 1867-1882.e1821
- [35] Bommasamy H, Back S H, Fagone P, *et al.* ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 2009, **122**(Pt 10): 1626-1636
- [36] Sriburi R, Bommasamy H, Buldak G L, *et al.* Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. *J Biol Chem*, 2007, **282**(10): 7024-7034
- [37] Chang T K, Lawrence D A, Lu M, *et al.* Coordination between two branches of the unfolded protein response determines apoptotic cell fate. *Mol Cell*, 2018, **71**(4): 629-636.e625
- [38] Lu M, Lawrence D A, Marsters S, *et al.* Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*, 2014, **345**(6192): 98-101
- [39] Yamamoto K, Sato T, Matsui T, *et al.* Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*, 2007, **13**(3): 365-376
- [40] Qi L, Tsai B, Arvan P. New insights into the physiological role of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Trends Cell Biol*, 2017, **27**(6): 430-440
- [41] Li H, Korennykh A V, Behrman S L, *et al.* Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(37): 16113-16118
- [42] Welihinda A A, Kaufman R J. The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and transphosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem*, 1996, **271**(30): 18181-18187
- [43] Papa F R, Zhang C, Shokat K, *et al.* Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science*, 2003, **302**(5650): 1533-1537
- [44] Wang L, Perera B G, Hari S B, *et al.* Divergent allosteric control of the IRE1alpha endoribonuclease using kinase inhibitors. *Nat Chem Biol*, 2012, **8**(12): 982-989
- [45] Lee K P, Dey M, Neculai D, *et al.* Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell*, 2008, **132**(1): 89-100
- [46] Wiseman R L, Zhang Y, Lee K P, *et al.* Flavonol activation defines an unanticipated ligand-binding site in the kinase-RNase domain of IRE1. *Mol Cell*, 2010, **38**(2): 291-304
- [47] Ferri E, Le Thomas A, Wallweber H A, *et al.* Activation of the IRE1 RNase through remodeling of the kinase front pocket by ATP-competitive ligands. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 6387
- [48] Ali M M, Bagratuni T, Davenport E L, *et al.* Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *EMBO J*, 2011, **30**(5): 894-905
- [49] Korennykh A V, Egea P F, Korostelev A A, *et al.* The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*, 2009, **457**(7230): 687-693
- [50] Credle J J, Finer-Moore J S, Papa F R, *et al.* On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(52): 18773-18784
- [51] Zhou J, Liu C Y, Back S H, *et al.* The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(39): 14343-14348
- [52] Tran N H, Carter S D, De Maziere A, *et al.* The stress-sensing

- domain of activated IRE1alpha forms helical filaments in narrow ER membrane tubes. *Science*, 2021, **374**(6563): 52-57
- [53] Tam A B, Koong A C, Niwa M. Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD. *Cell Rep*, 2014, **9**(3): 850-858
- [54] Gardner B M, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, 2011, **333**(6051): 1891-1894
- [55] Karagoz G E, Acosta-Alvear D, Nguyen H T, *et al.* An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1. *Elife*, 2017, **6**: e30700
- [56] Wang P, Li J, Tao J, *et al.* The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *J Biol Chem*, 2018, **293**(11): 4110-4121
- [57] Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot L M, *et al.* Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2000, **2**(6): 326-332
- [58] Oikawa D, Kimata Y, Kohno K, *et al.* Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp Cell Res*, 2009, **315**(15): 2496-2504
- [59] Kimata Y, Oikawa D, Shimizu Y, *et al.* A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol*, 2004, **167**(3): 445-456
- [60] Pincus D, Chevalier M W, Aragon T, *et al.* BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 2010, **8**(7): e1000415
- [61] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011, **334**(6059): 1081-1086
- [62] Amin-Wetzel N, Saunders R A, Kamphuis M J, *et al.* A J-Protein co-chaperone recruits BiP to monomerize IRE1 and repress the unfolded protein response. *Cell*, 2017, **171**(7): 1625-1637.e1613
- [63] Adams C J, Kopp M C, Larburu N, *et al.* Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Front Mol Biosci*, 2019, **6**: 11
- [64] Yu J, Li T, Liu Y, *et al.* Phosphorylation switches protein disulfide isomerase activity to maintain proteostasis and attenuate ER stress. *EMBO J*, 2020, **39**(10): e103841
- [65] Eletto D, Eletto D, Dersh D, *et al.* Protein disulfide isomerase A6 controls the decay of IRE1alpha signaling *via* disulfide-dependent association. *Mol Cell*, 2014, **53**(4): 562-576
- [66] Eletto D, Eletto D, Boyle S, *et al.* PDIA6 regulates insulin secretion by selectively inhibiting the RIDD activity of IRE1. *FASEB J*, 2015, **30**(2): 653-665
- [67] Kovaleva V, Yu L Y, Ivanova L, *et al.* MANF regulates neuronal survival and UPR through its ER-located receptor IRE1alpha. *Cell Rep*, 2023, **42**(2): 112066
- [68] Sepulveda D, Rojas-Rivera D, Rodriguez D A, *et al.* Interactome screening identifies the ER luminal chaperone Hsp47 as a regulator of the unfolded protein response transducer IRE1alpha. *Mol Cell*, 2018, **69**(2): 238-252.e237
- [69] Ariyama H, Kono N, Matsuda S, *et al.* Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem*, 2010, **285**(29): 22027-22035
- [70] Volmer R, Van Der Ploeg K, Ron D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(12): 4628-4633
- [71] Halbleib K, Pesek K, Covino R, *et al.* Activation of the unfolded protein response by lipid bilayer stress. *Mol Cell*, 2017, **67**(4): 673-684
- [72] Cho H, Stanzione F, Oak A, *et al.* Intrinsic structural features of the human IRE1alpha transmembrane domain sense membrane lipid saturation. *Cell Rep*, 2019, **27**(1): 307-320.e305
- [73] Ho N, Yap W S, Xu J, *et al.* Stress sensor Ire1 deploys a divergent transcriptional program in response to lipid bilayer stress. *J Cell Biol*, 2020, **219**(7): e201909165
- [74] Xu Y, Chen J, Chen J, *et al.* EI24 promotes cell adaption to ER stress by coordinating IRE1 signaling and calcium homeostasis. *EMBO Rep*, 2022, **23**(3): e51679
- [75] Sundaram A, Plumb R, Appathurai S, *et al.* The Sec61 translocon limits IRE1alpha signaling during the unfolded protein response. *Elife*, 2017, **6**: e27187
- [76] Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science*, 2006, **312**(5773): 572-576
- [77] Rodriguez D A, Zamorano S, Lisbona F, *et al.* BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1alpha. *EMBO J*, 2012, **31**(10): 2322-2335
- [78] He Y, Beatty A, Han X, *et al.* Nonmuscle myosin IIB links cytoskeleton to IRE1alpha signaling during ER stress. *Dev Cell*, 2012, **23**(6): 1141-1152
- [79] Morita S, Villalta S A, Feldman H C, *et al.* Targeting ABL-IRE1alpha signaling spares ER-stressed pancreatic beta cells to reverse autoimmune diabetes. *Cell Metab*, 2017, **25**(4): 883-897.e888
- [80] Mao T, Shao M, Qiu Y, *et al.* PKA phosphorylation couples hepatic inositol-requiring enzyme 1alpha to glucagon signaling in glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(38): 15852-15857
- [81] Zhu X, Zhang J, Sun H, *et al.* Ubiquitination of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) by the E3 ligase CHIP mediates the IRE1/TRAF2/JNK pathway. *J Biol Chem*, 2014, **289**(44): 30567-30577
- [82] Jwa M, Chang P. PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1alpha-mediated unfolded protein response. *Nat Cell Biol*, 2012, **15**(1): 123
- [83] Van Vliet A R, Giordano F, Gerlo S, *et al.* The ER stress sensor PERK coordinates ER-plasma membrane contact site formation through Interaction with Filamin-A and F-Actin remodeling. *Mol Cell*, 2017, **65**(5): 885-899
- [84] Li T, Zhao H, Guo G, *et al.* VMP1 affects endoplasmic reticulum stress sensitivity *via* differential modulation of the three unfolded protein response arms. *Cell Rep*, 2023, **42**(3): 112209
- [85] Martinon F, Chen X, Lee A H, *et al.* TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol*, 2010, **11**(5): 411-418

- [86] Qiu Q, Zheng Z, Chang L, *et al.* Toll-like receptor-mediated IRE1 α activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis. *EMBO J*, 2013, **32**(18): 2477-2490
- [87] Chopra S, Giovanelli P, Alvarado-Vazquez P A, *et al.* IRE1 α -XBP1 signaling in leukocytes controls prostaglandin biosynthesis and pain. *Science*, 2019, **365**(6450): eaau6499
- [88] Lipson K L, Fonseca S G, Ishigaki S, *et al.* Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab*, 2006, **4**(3): 245-254
- [89] Hayashi A, Kasahara T, Iwamoto K, *et al.* The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. *J Biol Chem*, 2007, **282**(47): 34525-34534
- [90] Saito A, Cai L, Matsuhisa K, *et al.* Neuronal activity-dependent local activation of dendritic unfolded protein response promotes expression of brain-derived neurotrophic factor in cell soma. *J Neurochem*, 2018, **144**(1): 35-49
- [91] Mahadevan N R, Rodvold J, Sepulveda H, *et al.* Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(16): 6561-6566
- [92] Mahadevan N R, Anufreichik V, Rodvold J J, *et al.* Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells and impair CD8(+) T cell priming. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e51845
- [93] Taylor R C, Dillin A. XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell*, 2013, **153**(7): 1435-1447
- [94] Williams K W, Liu T, Kong X, *et al.* Xbp1s in pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab*, 2014, **20**(3): 471-482
- [95] Zhang H, Yue Y, Sun T, *et al.* Transmissible endoplasmic reticulum stress from myocytes to macrophages is pivotal for the pathogenesis of CVB3-induced viral myocarditis. *Sci Rep*, 2017, **7**: 42162
- [96] Avril T, Vauleon E, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis*, 2017, **6**(8): e373
- [97] Wei C, Yang X, Liu N, *et al.* Tumor microenvironment regulation by the endoplasmic reticulum stress transmission mediator Golgi Protein 73 in mice. *Hepatology*, 2019, **70**(3): 851-870
- [98] Ozbey N P, Imanikia S, Krueger C, *et al.* Tyramine acts downstream of neuronal XBP-1s to coordinate inter-tissue UPR (ER) activation and behavior in *C. elegans*. *Dev Cell*, 2020, **55**(6): 754-770.e6
- [99] Tirosh A, Tuncman G, Calay E S, *et al.* Intercellular transmission of hepatic ER stress in obesity disrupts systemic metabolism. *Cell Metab*, 2020, **55**(6): 754-770
- [100] Sprenkle N T, Lahiri A, Simpkins J W, *et al.* Endoplasmic reticulum stress is transmissible *in vitro* between cells of the central nervous system. *J Neurochem*, 2019, **148**(4): 516-530
- [101] Imanikia S, Ozbey N P, Krueger C, *et al.* Neuronal XBP-1 activates intestinal lysosomes to improve proteostasis in *C. elegans*. *Curr Biol*, 2019, **29**(14): 2322-2338.e2327
- [102] McNally B D, Ashley D F, Hanschke L, *et al.* Long-chain ceramides are cell non-autonomous signals linking lipotoxicity to endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1748
- [103] Young R M, Ackerman D, Quinn Z L, *et al.* Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev*, 2013, **27**(10): 1115-1131
- [104] Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, *et al.* XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature*, 2014, **508**(7494): 103-107
- [105] Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, *et al.* ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*, 2005, **24**(19): 3470-3481
- [106] Mennerich D, Kellokumpu S, Kietzmann T. Hypoxia and reactive oxygen species as modulators of endoplasmic reticulum and Golgi homeostasis. *Antioxid Redox Signal*, 2019, **30**(1): 113-137
- [107] Rouschop K M, Dubois L J, Keulers T G, *et al.* PERK/eIF2 α signaling protects therapy resistant hypoxic cells through induction of glutathione synthesis and protection against ROS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(12): 4622-4627
- [108] Tang X, Lucas J E, Chen J L, *et al.* Functional interaction between responses to lactic acidosis and hypoxia regulates genomic transcriptional outputs. *Cancer Res*, 2012, **72**(2): 491-502
- [109] Dong L, Krewson E A, Yang L V. Acidosis activates endoplasmic reticulum stress pathways through GPR4 in human vascular endothelial cells. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(2): 278
- [110] Maeyashiki C, Melhem H, Hering L, *et al.* Activation of pH-Sensing receptor OGR1 (GPR68) induces ER Stress via the IRE1 α /JNK pathway in an intestinal epithelial cell model. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 1438
- [111] Denzel M S, Antebi A. Hexosamine pathway and (ER) protein quality control. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, **33**: 14-18
- [112] Moore C E, Omikorede O, Gomez E, *et al.* PERK activation at low glucose concentration is mediated by SERCA pump inhibition and confers preemptive cytoprotection to pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol*, 2011, **25**(2): 315-326
- [113] Oakes S A, Papa F R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol*, 2015, **10**: 173-194
- [114] Costa-Mattioli M, Walter P. The integrated stress response: from mechanism to disease. *Science*, 2020, **368**(6489): eaat5314
- [115] Beriault D R, Werstuck G H. Detection and quantification of endoplasmic reticulum stress in living cells using the fluorescent compound, thioflavin T. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1833**(10): 2293-2301
- [116] Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1804**(7): 1405-1412
- [117] Verwilst P, Kim K, Sunwoo K, *et al.* Revealing protein aggregates under thapsigargin-Induced ER Stress using an ER-targeted thioflavin. *ACS sensors*, 2019, **4**(11): 2858-2863
- [118] Melo E P, Konno T, Farace I, *et al.* Stress-induced protein disaggregation in the endoplasmic reticulum catalysed by BiP. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 2501

The Mechanism of The Unfolded Protein Response Activation*

WANG Li-Kun**, LI Tao, XU Fen-Fen

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) lumen causes ER stress, which triggers the unfolded protein response (UPR) to restore protein homeostasis. So far, three UPR sensors have been identified, including IRE1, PERK, and ATF6. All of them are ER transmembrane proteins, which become activated and initiate downstream UPR signals under ER stress. Though first discovered during the study of how cells respond to ER stress, it remains unclear how the ER stress signal is sensed by the three UPR sensors. Structural studies provide insight into how direct binding of ER-localized peptides to the luminal domain of IRE1 and PERK facilitates their oligomerization and thus activation. In another model, dissociation of the ER chaperone BiP is the key to the UPR activation. In addition, further studies reveal that the UPR not only functions in maintaining protein homeostasis and is not solely activated in response to the accumulation of unfolded proteins in the ER. Lipid bilayer stress, cytosolic factors or intercellular signals may initiate the UPR. Despite the importance of the UPR in physiology and pathophysiology, how the UPR is activated under physiological or pathophysiological conditions are largely unknown. Developing novel strategy to monitor the unfolded and misfolded proteins in the ER lumen will advance our understanding of the relationship between ER stress and the UPR. This paper introduces the discovery and the canonical pathways of the UPR, with a focus on the current mechanistic understanding of the UPR activation, and discusses the relationship between the UPR and ER stress as well as related questions.

Key words endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, IRE1, PERK, ATF6

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0137

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32170785) and the CAS Youth Interdisciplinary Team Program (JCTD-2021-07).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64881162, E-mail: wanglikun@ibp.ac.cn

Received: April 10, 2023 Accepted: April 19, 2023