

Posttranslacijske modifikacije proteina kod bakterija

Šambar, Adela

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:350129>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-08-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Adela Šambar

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE PROTEINA KOD BAKTERIJA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: prof.dr.sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2021. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

18. svibnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

24. rujna 2021.

Mentor rada: prof.dr.sc. Ita Gruić Sovulj

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....	II
2.1. Proteini.....	ii
2.1.1. Građa proteina	ii
2.1.2. Podjela proteina.....	3
2.2. Posttranslacijske modifikacije	5
2.2.1. Tipovi posttranslacijskih modifikacija	6
2.3. Acetilacija.....	8
2.3.1. Uvod u acetilaciju	8
2.3.2. N-terminalna acetilacija	8
2.3.3. N- ε acetilacija	10
2.3.4. Acetiltransferaze i deacetiltransferaze u bakterijama	11
2.3.5. Spektrometrija masa.....	13
2.4. Fosforilacija	15
2.4.1. Uvod u fosforilaciju.....	15
2.4.2. Kinaze i fosfataze	16
2.5. Zaključak	21
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	23

§ Sažetak

Uloga proteina za život na Zemlji je neosporna. Proteini su osnovni gradivni spojevi svih živih bića. Osim što grade živa bića, proteini su osnovni pokretači svih životnih funkcija. Građeni su od aminokiselina. Redoslijed aminokiselina i njihove posebnosti određuju ulogu proteina i njihove funkcije u organizmu. Sinteza proteina događa se u dva koraka, koje nazivamo transkripcija i translacija. Transkripcija je prepisivanje genetske upute iz DNA u glasničku molekulu RNA ili mRNA, a događa se u jezgri stanice. Translacija je prevođenje redoslijeda dušičnih baza molekule mRNA u redoslijed aminokiselina u peptidu.¹ Zadnja faza u biosintezi proteina uključuje smatanje proteina i sve modifikacije koje će zajedno prevesti protein u biološki aktivnu formu. Posttranslacijske modifikacije proteina skup su svih kemijskih reakcija, odnosno, preinaka proteina nakon njihove sinteze i otpuštanja s ribosoma.

Posttranslacijske modifikacije proteina kod bakterija postaju vrlo važno područje istraživanja budući da one imaju važnu ulogu u staničnim procesima poput sinteze proteina, metabolizmu dušika, klijanju spora i virulenciji. Svako novo otkriće posttranslacijskih modifikacija proteina kod bakterija otvara nove mogućnosti napretka medicine i mogućnosti liječenja zaraznih bolesti. Proučavanje posttranslacijskih modifikacija proteina kod bakterija dovelo je do saznanja o složenosti posttranslacijskih modifikacija proteina kod bakterija i sposobnostima prilagodbe bakterija okolišu te utjecaja na ostali živi svijet.^{2,3}

§ 1. UVOD

Proteini ili bjelančevine su, uz vodu i ostale važne biološke makromolekule, najvažnije tvari u organizmu. Djeluju kao katalizatori, mogu prenositi živčane impulse, najvažniji su čimbenik u rastu i razvoju tkiva. Proteini su sastavni dijelovi svake stanice, što ih čini osnovom života na Zemlji. Važnost proteina za živi svijet dokazuje i porijeklo naziva. Pojam potječe od grčke riječi *proteus* što znači prvi, najvažniji.⁴

Većina proteina svoju aktivnu biološku ulogu obavlja kao globularni protein, tako da su modifikacije, acetilacija i fosforilacija, vrlo bitne za funkciju tih proteina, a i ostale modifikacije, jer o njima ovise životne funkcije svih živih bića na Zemlji.

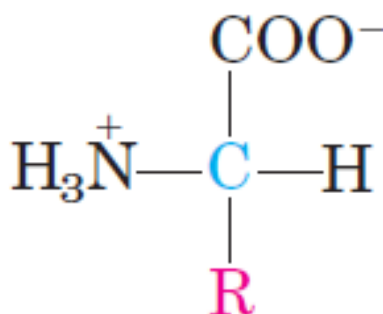
Postoji velik broj posttranslacijskih modifikacija proteina (dalje PTM), a najčešće su cijepanje proteina na specifičnim mjestima te kovalentno dodavanje ili uklanjanje pojedinih funkcionalnih skupina. PTM povećavaju broj funkcija proteina, tj. omogućavaju lokalizaciju proteina u pojedine organele u stanici, regulaciju aktivnosti pojedinih proteina (osobito enzima) te njihovu interakciju s drugim molekulama u stanici. PTM su reverzibilne ili ireverzibilne kovalentne modifikacije proteina koje slijede nakon sinteze proteina.⁵ Većina PTM se odvija neposredno nakon translacije, no neke se odvijaju i kasnije, ovisno o potrebi u stanici i organizmu. U nastavku pisanja rada slijedi opis dviju vrsta modifikacija: acetilacije i fosforilacije i njihove značajke.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. PROTEINI

2.1.1. Građa proteina

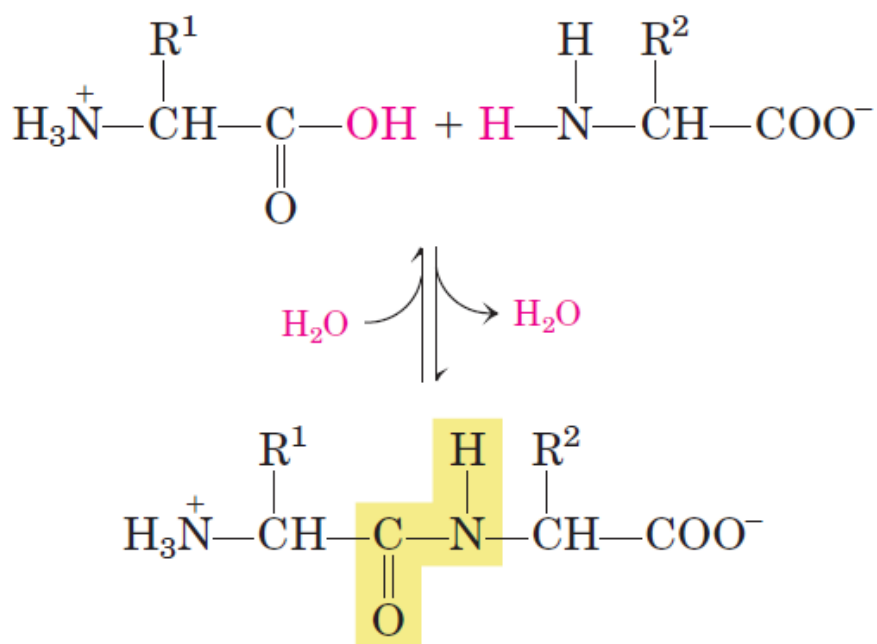
Proteini ili bjelančevine izgrađeni su od aminokiselina. Aminokiselina ima na središnji ugljikov atom vezanu amino-skupinu ($-\text{NH}_3^+$) i karboksilnu skupinu ($-\text{COO}^-$). Osim tih dviju skupina koje ima svaka aminokiselina, za središnji ugljikov atom je vezan atom vodika te R-skupina (bočni ogranak), tj. skupina po kojoj se aminokiseline međusobno razlikuju (slika 1.). Postoji 20 različitih aminokiselina koje izgrađuju proteine (proteinogene aminokiseline) i one se međusobno razlikuju upravo po R-skupini.¹



Slika 1. Građa aminokiseline (preuzeto i prilagođeno iz David L. Nelson, Michael M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry 7th edition, W. H. Freeman & Company, New York, 2017, str.76)

Aminokiseline se u lance spajaju peptidnim vezama tako da se aminoskupina jedne aminokiseline peptidnom vezom spaja s karboksilnom skupinom druge aminokiseline (slika 2.), pri čemu se izdvaja molekula vode.

Proteini su građeni od velikog broja međusobno povezanih aminokiselina u dugačke lance koje zovemo polipeptidnim lancima, a koji se sastoje od pravilnog ponavljajućeg dijela koji se naziva okosnicom. Genetička poruka sadržana u molekulama DNA određuje specifičan slijed aminokiselina nekog proteina koji određuje njegov trodimenzionalni oblik.



Slika 2. Nastanak peptidne veze (preuzeto i prilagođeno iz David L. Nelson, Michael M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry 7th edition, W. H. Freeman & Company, New York, 2017, str.85)

Činjenica je da su interakcije koje podržavaju prostornu građu proteina relativno slabe. Mogu se prekinuti zagrijavanjem, dodatkom kiseline ili dodavanjem soli teških metala. Proces narušavanja ili razaranja prirodne prostorne građe molekula proteina zove se denaturacija (lat. *de*= ukidanje+ *natura*= priroda). Ukoliko se poremeti prostorna građa proteina on prestaje biti biološki aktivan.⁴

2.1.2. Podjela proteina

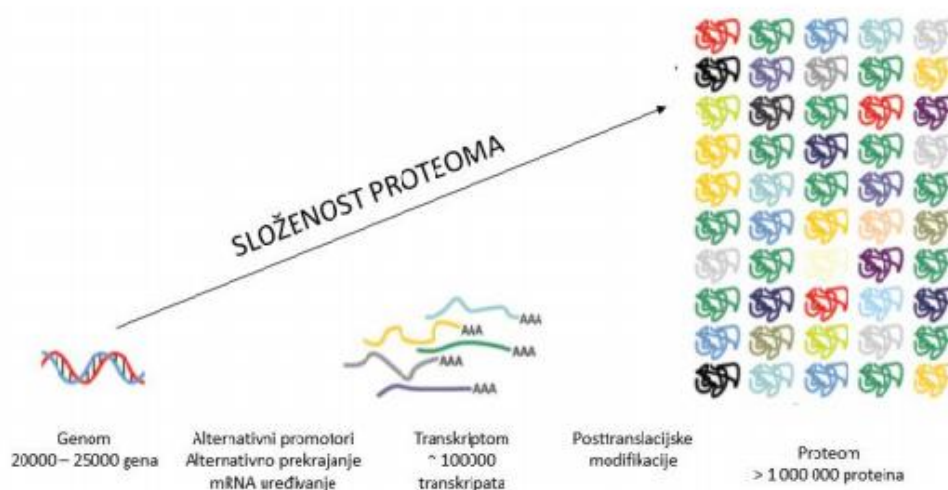
Proteini se dijele u tri skupine, koje se međusobno razlikuju po kemijskim svojstvima. Prva skupina su skleroproteini, proteini koji su netopljivi u vodi, imaju fibrilarnu strukturu, a služe kao potporni elementi. Molekula im je pravilne nitaste strukture. Primjeri su: kolagen, keratin i miozin mišića. Druga skupina su globularni ili sferoproteini. Oni su topljivi u vodi ili u razrijeđenim otopinama soli. Molekula im je kuglasta i nepravilna je. Primjeri su: proteini krvne plazme, proteini bjelanjka jajeta i najveći broj enzima. Treća skupina su proteinski kompleksi. Izgrađeni su od proteinskog dijela i neke neproteinske ili prostetičke skupine. U toj skupini razlikujemo glikoproteine, lipoproteine, fosfoproteine i metaloproteine.⁴

Enzimi su velika skupina proteina koji ubrzavaju i omogućavaju kemijske reakcije u organizmima. Nazivamo ih još i biološkim katalizatorima ili biokatalizatorima.

Gotovo svi metabolički procesi u stanicama ovise o aktivnosti enzima i bez njih život ne bi bio moguć. Enzimi djeluju na molekule koje zovemo supstrati i kemijski ih mijenjaju u nove molekule koje zovemo produkti. Enzimi mogu razgraditi veće molekule na manje ili vezati više manjih molekula u veće. Supstrati moraju biti vrlo precizno orijentirani u aktivnom mjestu da bi došlo do reakcije, zato oblik enzima ima zadaću usmjeriti supstrat kako bi reakcija bila brža, a enzim učinkovit. Svaki enzim je specifičan, zbog svoje građe aktivnog mjesta moći će primiti samo supstrate koji mu odgovaraju.¹

2.2. POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE

Posttranslacijska modifikacija (PTM) biokemijska je modifikacija koja se javlja na jednoj ili više aminokiselina na proteinu nakon što je protein sintetiziran i otpušten s ribosoma. Posttranslacijske modifikacije odnose se na sve promjene u aminokiselinskom slijedu proteina nakon njegove sinteze. Mogu uključivati modifikaciju aminokiselinskog bočnog lanca, terminalne amino ili karboksilne skupine nakon sinteze proteina.^{1,6} Proteinske PTM povećavaju funkcionalnu raznolikost proteoma kovalentnim dodavanjem funkcionalne skupine ili proteina, proteolitičkim cijepanjem regulatornih podjedinica ili razgradnjom cijelog proteina. Na slici 3. vidljivo je da posttranslacijske modifikacije eksponencijalno povećavaju proteom u odnosu na sam genom.¹

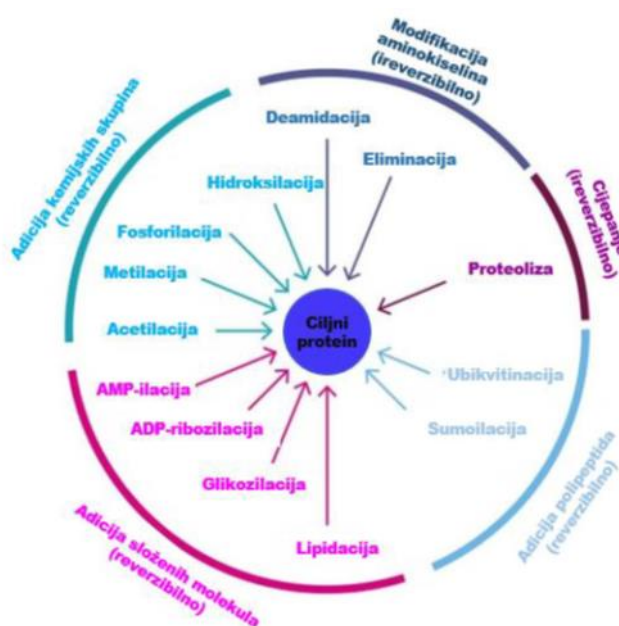


Slika 3. PTM znatno povećavaju funkcionalnu kompleksnost proteoma (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html> (datum pristupa 27.kolovoza 2021.))

2.2.1. Tipovi posttranslacijskih modifikacija

Posttranslacijske modifikacije mogu se dogoditi na bočnim ograncima aminokiselina ili na C- ili N-krajevima proteina. Mogu proširiti kemijski spektar 20 standardnih aminokiselina modificirajući postojeću funkcionalnu skupinu ili uvodeći novu poput fosfata.⁷ Fosforilacija je vrlo čest mehanizam za regulaciju aktivnosti enzima i najčešća je posttranslacijska modifikacija te će u ovom radu biti detaljnije obrađena.

Mjesta koja se često podvrgavaju posttranslacijskoj modifikaciji su ona koja imaju funkcionalnu skupinu koja može poslužiti kao nukleofil u reakciji: hidroksilne skupine serina, treonina i tirozina, amino skupina u lizinu, gvanidinijska u argininu i imidazolska u histidinu, tiolatni anion iz cisteina, karboksilati u aspartatu i glutamatu te N- i C-krajevi. Osim toga, iako je amid iz asparagina slab nukleofil, može poslužiti kao mjesto vezivanja glikana. Rijede modifikacije mogu se dogoditi kod oksidiranih metionina i kod nekih metilena u bočnim lancima.



Slika 4. Pregled pojedinih posttranslacijskih modifikacija (preuzeto i prilagođeno iz Post-Translational Modifications: an overview, 13.lipnja 2017, <https://www.ptglab.com/news/blog/post-translational-modifications-an-overview/> (datum pristupa 10.travnja 2021.)

Neki od ostalih tipova posttranslacijskih modifikacija proteina sastoje se od cijepanja peptidnih veza te se i stvaranje disulfidnih veza iz ostataka cistina također može nazvati posttranslacijskom modifikacijom.

Na slici 4. su nabrojene PTM, a neke od njih ću ukratko sada definirati, dok će se kao što je rećeno, acetilacija i fosforilacija detaljnije obraditi. Metilacija je dodavanje metilne skupine na protein i odvija se na boćnim ograncima lizina i arginina. Prijenos metilnih skupina odvija se uz pomoć donora zvanog S-adenozilmetionin, a reakciju izvode enzimi metiltransferaze. Metilacija je najćešći oblik alkilacije proteina.⁸

Acilacija proteina je postupak dodavanja acilne funkcionalne skupine proteinu, a to je skupina koja sadrži atom kisika dvostrukom vezom vezan na atom ugljika i acilnu skupinu vezanu na atom ugljika. Acilacija proteina primijećena je kao mehanizam koji kontrolira biološku signalizaciju. Jedna od istaknutih vrsta acilacija je acilacija masnih kiselina. Razlićite vrste masnih kiselina sudjeluju u globalnoj acilaciji proteina. Palmitoilacija je vrsta aciliranja kod koje je mononezasićena masna kiselina, palmitoleinska kiselina kovalentno vezana za serinski ili treoninski boćni ogranak proteina. Takva vrsta acilacije se još naziva S-acilacija.⁹

Formilacija je dodavanje formilne funkcionalne skupine na N-kraj proteina. Formilnu funkcionalnu skupinu ćini karbonil vezan za vodik. Ovu vrstu modifikacije kataliziraju enzimi zvani formiltransferaze. Otkriveno je da formilacija kao posttranslacijska modifikacija proteina kod bakterija sudjeluje u pokretanju sinteze proteina.¹⁰

Glikozilacija je posttranslacijska modifikacija proteina koja ukljućuje vezanje šećera za proteine. To je modifikacija u kojoj su glikanski dijelovi kovalentno povezani s aminokiselinskim boćnim ograncima proteina pa moćemo govoriti o N-, O- ili C- glikozilaciji ovisno o tome na koji atom boćnog ogranka aminokiseline se šećeri vežu. Ako se vežu na dušikov atom asparagina govorimo o N-glikozilaciji. Ako se vežu na kisikov atom hidroksilne skupine serina ili treonina onda govorimo o O-glikozilaciji, a ako su povezani putem ugljik-ugljik veza s proteinima, onda govorimo o C-glikozilaciji. Glikani imaju razlićite strukturne i funkcionalne uloge u membranskim i izlućenim proteinima. Većina proteina sintetiziranih na hrapavom endoplazmatskom retikulumu podvrgava se glikozilaciji.¹¹

2.3. ACETILACIJA

2.3.1. Uvod u acetilaciju

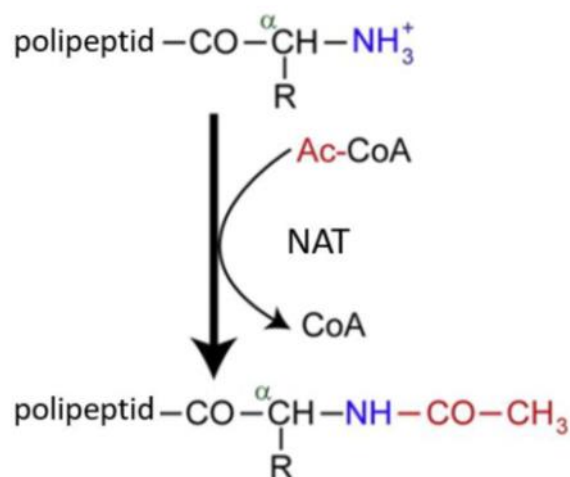
Acetilacija je proces kotranslacijske ili posttranslacijske modifikacije proteina na način da se acetilna skupina donira s acetil-koenzima A te se veže na protein na α -amino skupinu N-kraja proteina, pa u tom slučaju govorimo o N- α acetilaciji, odnosno N-terminalnoj acetilaciji. To je modifikacija koja se rjeđe javlja u bakterijama. Ukoliko se acetilna skupina veže na protein na ϵ -amino skupinu lizina, riječ je o N- ϵ acetilaciji, odnosno o lizinskoj acetilaciji.¹² Enzimi koji provode ove PTM zovu se acetiltransferaze te se s obzirom na reakciju acetilacije koju kataliziraju dijele na N-terminalne acetiltransferaze i lizinske acetiltransferaze. Acetilom je podskup proteoma, a čini ga skup svih proteina modificiranih procesom acetilacije. Gotovo 80% – 90 % proteina kotranslacijski se acetilira na N-kraju, dok se ostali acetiliraju na N-kraju posttranslacijski. Acetilacija na N-kraju smatra se ireverzibilnom (nepovratnom).¹²

Acetilacija je iznimno važna modifikacija kod proteina. Istraživanja su dokazala tisuće acetiliranih proteina sisavaca. Acetilacija ima značajan utjecaj na ekspresiju gena i metabolizam.

2.3.2. N-terminalna acetilacija

N-terminalna acetilacija proces je dodavanja acetilne skupine na α -amino skupinu N-kraja proteina (slika 5.). Ovo je vrlo čest proces kod eukariota te se događa na većini proteina, dok se kod prokariota događa rijetko, posttranslacijski, a odvija se na proteinima ribosoma.^{6,12} Ta vrsta acetilacije katalizirana je enzimima koji se nazivaju N-terminalne acetiltransferaze (NAT) koji imaju za ulogu prenijeti acetilnu skupinu iz acetil-koenzima A na α -amino skupinu nosivca novosintetiziranog polipeptidnog lanca.

NAT možemo podijeliti u dvije skupine s obzirom na to na koju amino skupinu se prenosi acetilna skupina. Prva je prijenos acetilne skupine na α -amino skupinu metionina u proteinima koji nisu supstrat enzima metioninskih aminopeptidaza, a druga skupina prenosi acetilnu skupinu na α -amino skupinu nakon što je protein podvrgnut djelovanju metioninske aminopeptidaze. Svi NAT-ovi su enzimi s jednom ili više domena. Jedna domena je katalitička, a ostale su pomoćničke. Glavni NAT kompleksi eukariota su NatA, NatB, NatC, NatD, NatE, NatF. Nabrojani NAT-ovi se razlikuju po lokalizaciji u stanici, ali kataliziraju iste reakcije.^{6,12}



Slika 5. N – terminalna acetilacija (preuzeto i prilagođeno iz A. Drazic, L. M. Myklebust, R. Ree, T. Arnese, The world of protein acetylation, *Biochimica e Biophysica Acta (BBA)- Proteins an Proteomics*, **1864(10)** (2016), str.1373.)

Uloge ove PTM su mnogobrojne. N-terminalna acetilacija sudjeluje u unutarstaničnoj lokalizaciji nekih proteina. Primjer je Arl3 protein koji sudjeluje u mnogo staničnih i fizioloških procesa. Ovaj protein se ne može lokalizirati u Golgijevom kompleksu ukoliko mu nedostaje N-terminalni acetat.

S druge strane, acetilacijom se pojedini proteini zadržavaju u citosolu te se inhibira njihovo usmjerenje u sekrecijske puteve. N-terminalna acetilacija također sprječava druge PTM na N-kraju te omogućuje određene protein-protein interakcije (primjeri su povećanje afiniteta proteina E2 prema proteinu E3 u procesu ubikvitinacije i stvaranje kompleksa aktina s tropomiozinom u regulaciji kontrakcije mišića). Pokazalo se da N-terminalna acetilacija ima ulogu i u olakšavanju smatanja proteina na način da stabilizira N-kraj aminokiseline. Ovo je dokazano u mutantima kvasca s delecijom NatA gena; u njima je višestruko povećana ekspresija gena koji kodiraju za šaperonske sustave. Rezultati pojedinih istraživanja ne daju jasne rezultate povećava li N-terminalna acetilacija ili smanjuje stabilnost proteina.¹² Pojedini NAT-ovi imaju ulogu u embrionalnom razvoju i regulaciji krvnog tlaka. Još jedna važna uloga N-terminalne acetilacije regulacija je lokalizacije proteasoma, kompleksa za razgradnju proteina. Proteasom je lokaliziran u jezgri, citoplazmi i granulama koje skladište proteasom. Precizna lokalizacija proteasoma, kao i njegova sekvestracija u granule rezultat su selektivne N-terminalne acetilacije. NatC izozim ima u ovom procesu ulogu ukoncentriravanja

proteasoma u jezgri, dok NatB izozim potiče stvaranje granula s proteasomom. Ovaj proces povezuje se sa starenjem stanice te povećanom proteolizom uslijed starenja. NatA izozim također je povezan sa selektivnom mitolizom (razgradnjom mitohondrija) na način da N-acetilira površinski receptor Atg32, čime se mitohondrij usmjerava na razgradnju. Postoji još ogroman broj uloga N-terminalne acetilacije, kao što su regulacija rada ribosoma, slaganje viriona pojedinih vrsta virusa, održavanje integriteta Golgijevog kompleksa, razdioba kromosoma u staničnoj diobi, stabilizacija nekih hormona te modifikacija N-kraja proteina modificiranih proteolizom (ti proteini mogu imati nekoliko N-krajeva), a sve više se istražuje uloga N-terminalne acetilacije u neurodegenerativnim bolestima, kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest te pri tumorigenezi (mutirana NatA pokazala se kao modifikator proteina koji sudjeluju u signalnim putevima ključnim za okidanje karcinogeneze te poremećaju staničnog ciklusa). Zbog brojnih uloga te primjena u medicini i molekularnoj biologiji ova je PTM zadnjih godina postala jedno od glavnih područja istraživanja jer će bolji uvid u njezinu ulogu dati potencijalno brojne odgovore na pitanja kako suzbiti teške neurodegenerativne i maligne bolesti.

N-terminalna acetilacija proteina može utjecati na stabilnost proteina, ali rezultati i mehanizam do sada nisu bili vrlo jasni. Vjerovalo se da N-terminalna acetilacija štiti proteine od razgradnje jer su acetilirani N-krajevi trebali blokirati N-terminalnu ubikvitinaciju i kasniju razgradnju proteina.¹² Međutim, nekoliko je studija pokazalo da N-terminalni acetilirani proteini imaju sličnu brzinu razgradnje kao i proteini s neblokiranom N-krajem. N-terminalna acetilacija proteina ribosoma može utjecati na sintezu proteina. Smanjenje brzine sinteze proteina za 23% -27% primijećeno je kod sojeva delecije NatA i NatB.

2.3.3. *N-ε acetilacija*

Proteini se obično acetiliraju na ostacima lizina i ova je reakcija ovisna o acetil-koenzimu A kao donoru acetilne skupine. Enzimi koji sudjeluju u procesu lizinske acetilacije, odnosno deacetilacije su lizinske acetiltransferaze (KAT) i lizinske deacetiltransferaze (KDAC), te proteini koji prepoznaju i vežu acetilirane lizine. Transkripcijski faktori i KAT-ovi sadrže ovakve proteine sa posebnom domenom, bromodomenom, kojom se prepoznaje acetilirani lizin. Za razliku od N-terminalne acetilacije, acetilacija lizina je reverzibilan (povratni) proces poput fosforilacije koja će biti kasnije objašnjena. Kod bakterija je češća lizinska acetilacija.

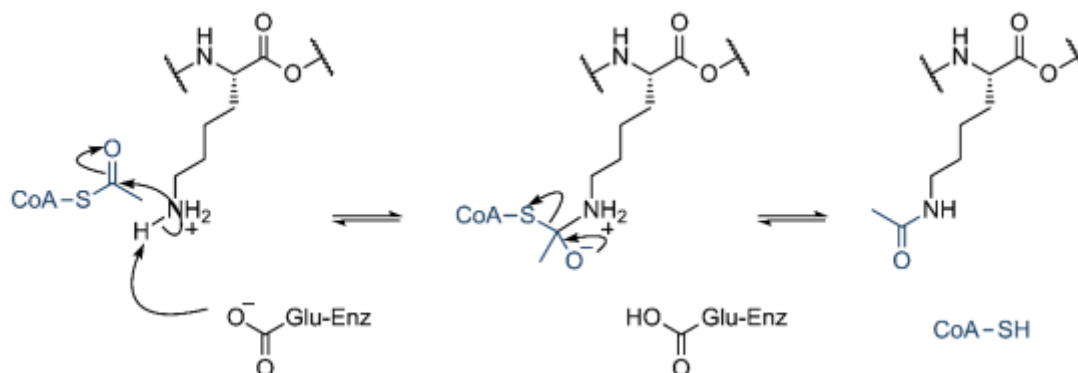
Regulacija transkripcijskih faktora, efektorskih proteina, molekularnih chaperona i citoskeletnih proteina acetilacijom i deacetilacijom važan je posttranslacijski regulatorni mehanizam. Ti regulatorni mehanizmi analogni su fosforilaciji i defosforilaciji djelovanjem kinaza i fosfataza.

Postranslacijskom lizinskom acetilacijom regulira se i protein p53, protein tumor supresor koji igra važnu ulogu u prijenosu signala u stanicama, posebno u održavanju stabilnosti genoma sprječavanjem mutacija. Stoga je poznat i kao “čuvar genoma”.¹²

2.3.4. Acetiltransferaze i deacetiltransferaze u bakterijama

Prvotno su se lizinske acetiltransferaze nazivale histonskim transferazama (HAT) zato što su acetilirani lizinski ostaci prvi puta otkriveni u histonima koji reguliraju transkripciju gena, ali je otkriveno da acetilacija lizina nije ograničena isključivo na proteine histona pa su nazvane lizinske acetiltransferaze (KAT).¹² Možemo ih svrstati u 3 glavne skupine: GNAT, MYST i CPB.¹² Kinetički mehanizmi ovih acetiltransferaza variraju. Dok GNAT-ovi tvore trodjelni kompleks koji omogućava direktan prijenos acetilne skupine, skupina MYST može, ili upotrijebiti ovaj trodjelni kompleksni mehanizam ili koristiti ping-pong mehanizam koji stvara acetilirani enzimski intermedijer. Za razliku od ovih većih skupina, pokazalo se da skupina p300 / CPB koristi sekvencijalni mehanizam nazvan Theorell-Chance mehanizam.⁷ GNAT-ovi su prisutni u bakterijskoj filogeniji i modificiraju širok raspon supstrata, uključujući ne samo proteine, već i male molekule ili metabolite. GNAT-ovi su enzimi koji mogu katalizirati prijenos acetilne skupine iz acetil-koenzima A u supstrate poput aminokiselina, poliamina, peptida, vitamina i proteina.¹³ Broj GNAT-ova prisutnih u određenom genomu može se razlikovati kod *Listeria monocytogenes* koji se sastoji od ~14 GNAT-ova, ali i kod *Streptomyces lividans* koja ima ~72 GNAT-ova. Acetiltransferaze su multienzimski kompleksi koji se sastoje od katalitičke podjedinice i podjedinica o kojima ovisi specifičnost pojedinog enzima. Za mehanizam ovih enzima ključna je podjedinica koja sadrži domenu s PHD prstima koja je odgovorna za vezanje slobodnog lizina, odnosno, neacetiliranog lizina.¹² Sam mehanizam ovih enzima sastoji se od nekoliko koraka: u prvom koraku bočni ogranak Glu djeluje kao baza i uzima proton s amino skupine lizina te sada amino skupina lizina djeluje kao nukleofil i napada karbonilni ugljikov atom molekule acetil-CoA čime dolazi do stvaranja amidne veze između dušikova atoma amino skupine lizina i karbonilnog ugljikovog atoma

acetata. U zadnjem koraku bočni ogranak Glu djeluje kao kiselina donirajući vodikov atom tiolnoj skupini CoA (slika 6.), čime dolazi do regeneracije početnog enzima.¹⁴



Slika 6. Mehanizam lizinskih acetiltransferaza na primjeru karnitin KAT (preuzeto i prilagođeno iz https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylation#/media/File:Lysine_acetylation.svg (datum pristupa 27.kolovoza 2021.))

Acetilacija lizina može se preokrenuti djelovanjem lizin deacetilaze. Kao i kod lizinskih acetiltransferaza, i kod lizinskih deacetiltransferaza (KDAC), u početku se govorilo o histonskim deacetiltransferazama (HDAC). Poznate su 4 skupine deacetiltransferaza: skupine 1, 2 i 4 su metaloenzimi ovisni o Zn^{2+} , a skupina 3 se još naziva sirtuini koji su ovisni o kofaktoru NAD^+ . Deacetiltransferaze ovisne o Zn^{2+} jednostavne su hidrolaze koje cijepaju acetilnu skupinu iz lizina kako bi se oslobodio acetat.⁶ Reakcija zahtijeva da sačuvani histidinski ostatak djeluje kao opća baza za aktiviranje vode vezane za metal koja napada karbonil acetilne skupine. U tu skupinu spadaju uglavnom histoni i transkripcijski faktori. Sirtuini se nalaze svuda po stanici i obavljaju razne uloge: utječu na stanične procese poput starenja, transkripcije, apoptoze, otpornosti na stres.^{6,12}

2.3.5. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je vrlo važna tehnika u analizi bioloških makromolekula. Određivanjem mase peptida ili proteina može se identificirati protein, odrediti slijed aminokiselina, identificirati i odrediti položaj posttranslacijskih modifikacija.¹⁵

Analiza proteina spektrometrijom masa obuhvaća analizu intaktnog proteina i analizu peptida nastalih digestijom proteina prije MS analize. Mogu se koristiti dva načina. Prvi je način; odozgo-nadolje (eng. top-down). Radi se o analizi primarnog slijeda aminokiselina i posttranslacijskih modifikacija intaktnog proteina unutar samog instrumenta. Na taj način se može odrediti aminokiselinski slijed proteina, analizirati mjesto fosforilacije. Preduvjet za kvalitetnu analizu je vrlo točno mjerenje masa.¹⁵

Drugi način je, odozdo-nagore, (engl. bottom-up). Primjenjuje se enzimaska ili kemijska odgradnja (cijepanje) proteina u gelu ili otopini prikladnom proteinazom, glikozidazom, hidrolizirajućim reagensom. Postupak obuhvaća: odgradnju proteina, analizu nastalih proteinskih ili peptidnih fragmenata te objedinjavanje dobivenih rezultata i oblikovanje ukupne strukture proteina i njegovih posttranslacijskih modifikacija.¹⁵

Posttranslacijska modifikacija fosforilacija može se utvrditi ciljanim analizama spektrometrije masa, ukoliko se prilagodi postupak pripreme uzorka, sa svrhom „aglomeriranja“¹⁵ fosfoproteina. Tehnika koja se pri tom primjenjuje je metaloafinitetna kromatografija, gdje se smjesa proteina obogaćuje fosfoproteinima, a nakon proteolize, mogu se detektirati fosfopeptidi snimanjem svih iona prekursora i iona produkata čija se masa razlikuje 98 Da (neutralni gubitak fosforne kiseline) te konsektivnim MS sekvenciranjem iona produkta. Njih se dalje analizira prema postojećim bazama podataka za identifikaciju fosfoproteina.¹⁵

Spektrometrija masa je također vrlo važna metoda u dokazivanju acetilacije. Glavna prednost spektrometrije masa je što se može koristiti ciljano, usredotočeno na određeni protein koji nas zanima. Dubina analize, tj. sposobnost otkrivanja visoke i niske razine acetilacije peptida, ovisi o više tehničkih faktora, uključujući afinitet i specifičnost antitijela te osjetljivost i preciznost spektrometra masa. Da bi se povećala učinkovitost izolacije, kao i smanjila pristranost za određene motive acetilacije, mnoga istraživanja trenutno koriste mješavinu antitijela za odvajanje acetil-peptida. Međutim, učinkovitost izolacije obično je između 25 i 40%.¹²

Proteomika koja se temelji na spektrometriji masa osnova je koja se koristi za identificiranje i vrjednovanje mogućih mjesta acetilacije. Tehnike kvantifikacije mogu se primijeniti za određivanje vremenske regulacije određenih mjesta, kao i za određivanje acetilacije.

Zanimljiva mjesta trebalo bi dalje proučiti *in vivo* stvaranjem mutanta koji oponašaju acetilirano (Gln supstitucije) ili neacetilirano (Arg ili Ala supstitucija) stanje i provođenjem fenotipske analize. Analiza pomoću KAT ili KDAC mutanta također je korisna za utvrđivanje ili potvrđivanje mehanizma ili posljedica acetilacije. Pored toga, reakcija acetilacije može se provesti *in vitro* pomoću pročišćenih enzima kako bi se potvrdilo njihovo sudjelovanje u kontroli acetiliranja određenih proteina. Niz istraživanja o acetilomu dalo je vrijedne rezultate za razumijevanje acetilacije u bakterijama. Kvantitativna spektrometrija masa može se koristiti za određivanje ovisnosti acetilacije o različitim uvjetima. Jedna metoda kvantifikacije koja se koristi u ispitivanjima acetiloma bakterija je stabilno izotopsko obilježavanje aminokiselinama u staničnoj kulturi (SILAC), u kojem se dvije stanične populacije koje se uspoređuju (npr. mutanti ili različiti uvjeti rasta) uzgajaju u mediju dopunjenom laganim ili teškim (neradioaktivnim) izotopno označenim aminokiselinama. Oznake se ugrade u sve proteine koji se proučavaju, a uzorci se tada kombiniraju i analiziraju istovremeno spektrometrijom masa.

Uz visoku razlučivost mase suvremenih spektrometara masa metodom SILAC moguće je provesti točnu i opsežnu kvantifikaciju bez korištenja stabilnih izotopa. Ova metoda je uspješno korištena za praćenje odnosa acetilacije proteina *E. coli* iz stanica uzgajanih u prisutnosti i odsutnosti glukoze u različitim vremenskim točkama, kao i za usporedbu promjena acetilacije u eksponencijalnoj fazi s rastom stacionarne faze u *B. subtilis*.¹⁴

Glavno pitanje na koje još nije dovoljno odgovoreno je: što je stehiometrija acetilacije (postotak acetiliranog proteina) i kako ili kada se mijenja? Pritom je važno razlikovati postotak modifikacije jer nizak postotak modifikacije može ukazivati na regulatorni događaj, dok visoki postotak modifikacije može sugerirati konstitutivnu promjenu potrebnu za smatranje proteina ili stvaranje stabilne interakcije. Kvaliteta antitijela za specifično acetilacijsko mjesto za određeni protein može olakšati istraživanje.

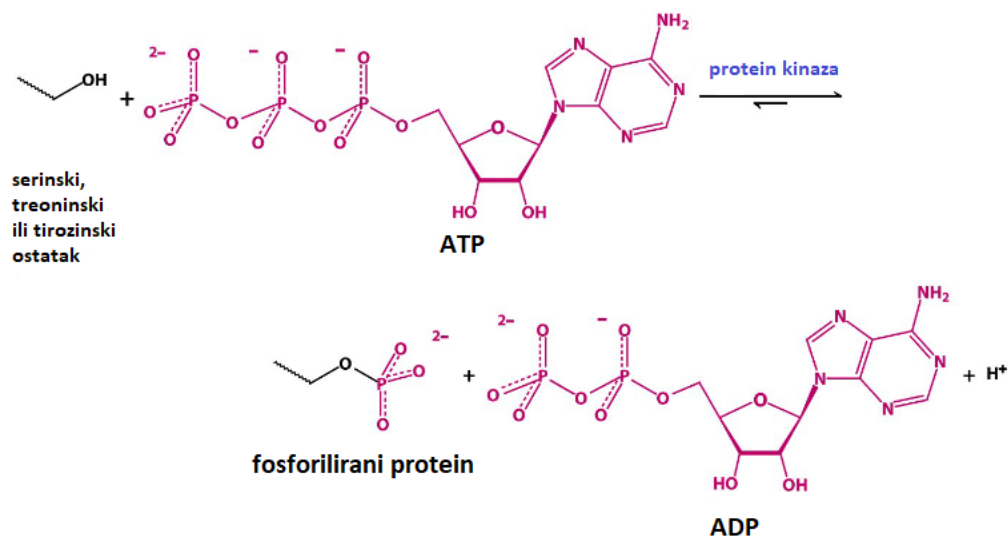
Kako su se poboljšale masene spektrometrijske tehnike i softver, mogućnosti primjene postaju sve veće.

2.4. FOSFORILACIJA

2.4.1. Uvod u fosforilaciju

Fosforilacija proteina izuzetno je važna PTM jer omogućuje proteinima da reverzibilno promijene svoju enzimsku aktivnost, staničnu lokalizaciju, vrijeme poluraspada i interakciju. Bakterije koriste fosforilaciju za prilagodbu promjenama u svom okruženju te za međustaničnu komunikaciju.¹⁶

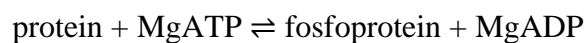
Fosforilacija obuhvaća prijenos fosforilne skupine s adenzin-trifosfata (ATP) na bočne ogranke pojedinih aminokiselina u ciljanom proteinu (slika 7.). Ova PTM predstavlja glavni regulacijski mehanizam reverzibilne modifikacije proteina. Enzimi koji provode fosforilaciju zovu se protein kinaze, a proteini koji uklanjaju fosfatne skupine s fosforiliranih proteina zovu se protein fosfataze. Pokusima s radioaktivnim ATP-om pokazalo se da je oko dvije trećine svih ljudskih proteina podložno fosforilaciji, a zapravo se smatra da je ovaj broj i puno veći. Aminokiseline koje su podložne fosforilaciji zovemo fosfoaminokiseline.¹⁶ U bakterijama se proteini fosforiliraju na bočnim ograncima serina, treonina i tirozina. Ovaj tip zovemo O-fosforilacija. Najdominatnija je fosforilacija serina, dok je fosforilacija treonina nešto rjeđa. Fosforilacija tirozina vrlo je rijetka i uglavnom se odvija na pojedinim signalnim receptorima koji imaju vlastitu tirozin kinaznu aktivnost, poput receptora za inzulin. Osim ovih, poznati su primjeri fosforilacije proteina na histidinu i argininu.¹⁷ Ovaj tip zovemo N-fosforilacija, no vrlo se rijetko odvija iz razloga što su ove aminokiseline u fosforiliranom obliku nestabilne. Fosforilacija dovodi do konformacijskih promjena u proteinu iz razloga što prevodi pojedine bočne ogranke iz nenabijenih polarnih u negativno nabijene, što ima značajan utjecaj na konformaciju pojedinog proteina. Fosforilacija je važna za stanične procese, osobito za njihovu funkciju, jer, aktivira ili deaktivira mnoge funkcije enzima.



Slika 7. Shematski prikaz fosforilacije proteina (preuzeto i prilagođeno iz David L. Nelson, Michael M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry 7th edition, W. H. Freeman & Company, New York, 2017, str.285)

2.4.2. Kinaze i fosfataze

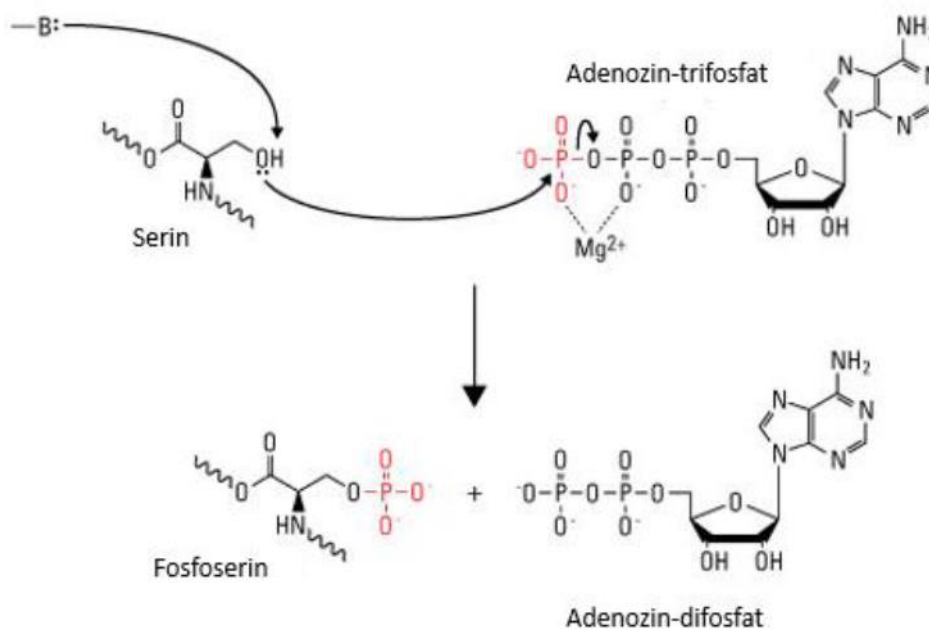
Protein kinaze su enzimi koji prenose fosforilnu skupinu s ATP-a na ciljani protein. Supstrati ovih enzima su protein koji se modificira, te ATP u obliku MgATP. Važnost ovih enzima lako je uvidjeti već iz njihovog broja. Samo kod čovjeka zasad je identificirano 518 različitih protein kinaza. Svaka od ovih kinaza ima zasebne supstrate ili skupine supstrata koje fosforiliraju, no sve kinaze imaju pojedine očuvane karakteristike. Primjerice, svim kinazama zajednički je jedan supstrat, a to je ATP. Osim toga, sve kinaze dijele slične strukturne karakteristike i sličan katalitički mehanizam. Kemijska reakcija koju kataliziraju kinaze glasi:



U pojedinim slučajevima supstrat kinaze može biti slobodan ATP, no koncentracija slobodnog ATP-a u stanici vrlo je mala iz razloga što magnezijevi ioni imaju vrlo velik afinitet prema ATP-u. Stoga kinaze možemo interpretirati kao metaloenzime kojima je magnezij (te u nekim primjerima mangan) potreban za katalizu. Pojedine kinaze prvo vežu MgATP, a zatim protein, neke prvo vežu protein, a zatim MgATP, dok neke istovremeno vežu oba supstrata.¹⁶

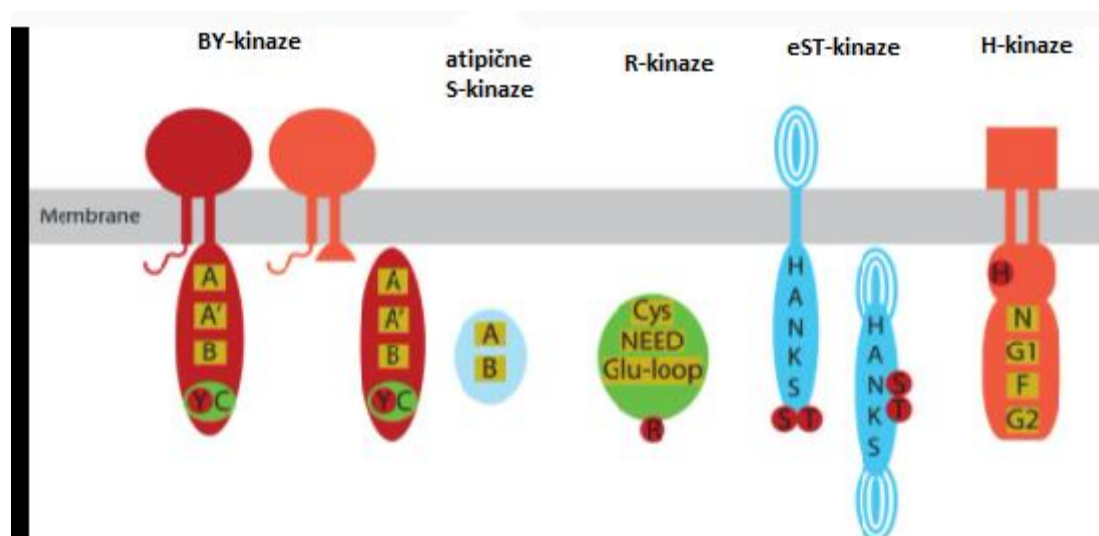
Slika 8. prikazuje generalni mehanizam djelovanja ovih enzima. U prvom koraku bočni ogranak aminokiseline (npr. Glu) djeluje kao baza te uzima proton bočnom ogranaku serina ciljanog proteina. Time kisik serina postaje jači nukleofil te napada γ -fosfor u ATP-u, pri čemu

nastaje veza između kisikovog atoma serina te fosfora u ortofosfatu. Ranije spomenuta aminokiselina u aktivnom mjestu sada djeluje kao kiselina te donira proton kisikovom atomu na β - fosforovom atomu, čime se enzim vraća u početno stanje.¹⁸



Slika 8. Katalitički mehanizam protein kinaza (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html> (datum pristupa 15.kolovoza 2021.))

Zanimljiva činjenica je to da su same kinaze regulirane fosforilacijom, bilo putem autofosforilacije ili putem drugih kinaza. Katalitička domena kinaza sastoji se od dvije poddomene (N i C), povezane peptidnom poveznicom koja ujedno i oblikuje aktivno mjesto kinaza. Aktivacija katalitičke domene vrši se putem fosforilacije, tzv. aktivacijske petlje. Osim katalitičke domene, kinaze se sastoje i od nekatalitičkih domena, koje imaju ulogu vezanja supstrata i interakcije s drugim (signalnim) proteinima. Kinaze se generalno klasificiraju s obzirom na aminokiselinu na koju djeluju. Mnoge kinaze djeluju i na serin i na treonin pa ih se stoga klasificira kao STK (serin/treonin kinaze). Tirozin kinaze fosforiliraju tirozin. Pojedine kinaze djeluju na sve tri aminokiseline pa se klasificiraju kao kinaze dualne specifičnosti, DSK. Ove kinaze su uglavnom odgovorne za fosforilaciju drugih kinaza.



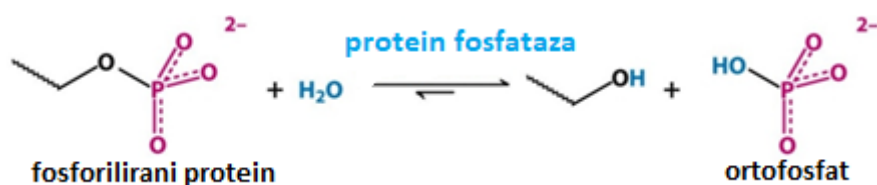
Slika 9. Pet vrsta bakterijskih protein kinaza (preuzeto i prilagođeno iz I. Mijaković, C. Grangeasse, K. Turgay, Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems, *FEMS Microbiol. Rev.*, **40(3)** (2016), 398-417

Na slici 9. je prikazano pet vrsta bakterijskih protein kinaza: prva slijeva je BY-kinaza, bakterijska tirozin kinaza, u obliku proteina s jednom membranom ili dva odvojena polipeptida. Da bi se kinaza aktivirala potrebna je interakcija između dva polipeptida. Dalje su atipične serin kinaze (S-kinaze), no one ne mogu autofosforilirati. Zatim su R-kinaze (arginin kinaze), imaju Cys (očuvani cistein), NEED segment i glutamat (nalazi se u Glu-petlji/fleksibilna petlja). Te tri domene su važne jer stabiliziraju i orijentiraju supstrat arginin u prijelaznom stanju reakcije prijenosa fosfata. Dalje su eST-kinaze, tj. serin/treonin kinaze koje imaju razne dodatne poddomene koje reguliraju njihovu aktivnost. H-kinaze (histidin kinaze) sastavljene su od izvanstanične domene povezane s citoplazmatskom domenom potrebnom za katalizu i dimerizaciju. Imaju očuvani histidinski ostatak koji može autofosforilirati. Uloga atipičnih S-kinaza i H-kinaza je kontrola metabolizma i regulacija ekspresije gena, a BY-kinaze i eST-kinaze fosforiliraju velik broj proteina i sudjeluju u regulaciji nekih dijelova fiziologije bakterija.¹⁶

Uloga protein kinaza je vrlo velika. Poznato je da se ljudski kinom, skup protein kinaza, sastoji od 518 gena i 106 pseudogena za protein kinaze. Uz to se pretpostavlja da bi ih 218 moglo biti povezano s ljudskim bolestima, npr. kronična mijeloična leukemija, stromalni tumor gastrointestinalnog sustava, još mnogih drugih sarkoma i karcinoma. Stoga je vrlo značajno

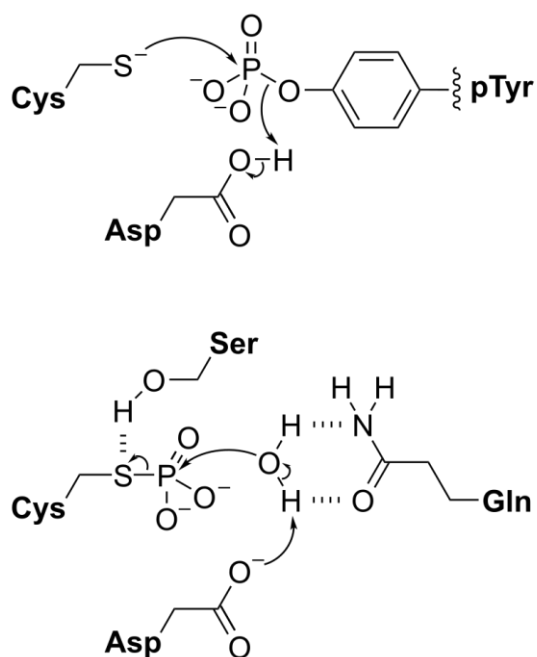
istražiti različite načine inhibicije protein kinaza kako bi se to iskoristilo u pronalasku potencijalnih lijekova.¹⁶

Fosfataze su enzimi koji imaju ulogu suprotnu kinazama. Njihova uloga je uklanjanje fosfatnih skupina s fosfoaminokiselina hidrolizom fosfoestera nastalih djelovanjem kinaza (slika 10.). Djelovanje kinaza i fosfataza održava homeostazu fosforilacije proteina, što regulira mnoge metaboličke i signalne procese u stanici. Protein fosfataze klasificiraju se u tri skupine: fosfoprotein fosfataze (PPP), protein metalofosfataze (PPM) i protein-tirozin fosfataze (PTP, ovisne o cisteinu). Katalitički mehanizam protein-tirozin fosfataza prikazuje slika 11. Za razliku od kinaza, koje prenose fosforilnu skupinu s ATP-a na protein, defosforilacija ne vraća fosforilnu skupinu na ADP, već ju oslobađa kao slobodni fosfatni ion iz razloga što bi za fosforilaciju ADP-a bio potreban utrošak energije. PTP defosforiliraju, osim proteina, i ugljikohidrate, mRNA i fosfoinozitide.



Slika 10. Shematski prikaz defosforilacije (preuzeto i prilagođeno iz David L. Nelson, Michael M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry 7th edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2017, str.285)

Tirozin fosfataza u aktivnom mjestu sadrži cistein ključan u katalitičkom mehanizmu ovih enzima. Tiolna skupina cisteina u prvom koraku nukleofilno napada fosforov atom vezan na tirozin, pri čemu nastaje fosfocisteinski intermedijer. Istovremeno, aspartat u aktivnom mjestu djeluje kao kiselina te protonira kisikov atom tirozina. U drugom koraku deprotonirani aspartat i glutamin u aktivnom mjestu pozicioniraju molekulu vode za nukleofilni napad na fosfocisteinski intermedijer. Kisikov atom vode nukleofilno napada fosforov atom, čime se fosfat otpušta i ujedno se regenerira enzim.¹⁹



Slika 11. Katalitički mehanizam tirozin-fosfataze (preuzeto i prilagođeno iz https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_phosphatase (datum pristupa 15. Kolovoza 2021.))

2.5. ZAKLJUČAK

Proteini su velike složene makromolekule koje obavljaju ključne uloge u organizmu. Sastavni su dio svih mišića, kostiju, unutarnjih organa, kataliziraju metaboličke reakcije, sudjeluju u replikaciji DNA, imaju zaštitnu i transportnu ulogu. Sastoje se od jednog ili više lanaca aminokiselina. Sinteza proteina započinje transkripcijom, a završava translacijom. Nakon, ili tijekom sinteze proteini se modificiraju posttranslacijskim modifikacijama. Pri tom se mijenjaju fizikalna i kemijska svojstva proteina, stabilnost i funkcije proteina. Veliki broj PTM-ova omogućuje povećanje funkcionalnosti proteoma u stanici. PTM proširuju spektar funkcija proteina: omogućuju njihovu lokalizaciju u pojedine organele u stanici, regulaciju aktivnosti pojedinih proteina te njihovu interakciju s drugim molekulama u stanici. U radu su detaljnije obrađene acetilacija i fosforilacija.

Acetilacija je vrlo važna modifikacija kod proteina. Istraživanjima je dokazano tisuće acetiliranih proteina kod sisavaca, npr. histoni, p53, tubulini. Značajno je da su među tim proteinima zastupljeni i protein kromatina i metabolički enzimi, što dokazuje važan utjecaj acetilacije na ekspresiju gena i metabolizam. Acetilaciju ubrzavaju enzimi acetiltransferaze, dok deacetiltransferaze ubrzavaju suprotnu reakciju acetilaciji, deacetilaciju. Kod bakterija se N-terminalna acetilacija događa posttranslacijski, ali je bitna za funkciju proteina. N-terminalna acetilacija sudjeluje u unutrašnjoj lokalizaciji nekih proteina, kao npr. Arl3. Ova PTM je postala jedno od glavnih područja istraživanja jer bi se njezina uloga mogla dati odgovore kako suzbijati teške neurodegenerativne i maligne bolesti.

Fosforilacija je najraširenija PTM. Predstavlja glavni regulacijski mehanizam reverzibilne modifikacije proteina. Pokusi su dokazali da je oko dvije trećine ljudskih proteina podložno fosforilaciji. Važna je za stanične procese, osobito za funkciju proteina jer aktivira ili deaktivira mnoge funkcije enzima. Enzimi koji provode fosforilaciju zovu se protein kinaze, a proteini koji provode suprotnu reakciju, defosforilaciju, zovu se protein fosfataze.

Važnu ulogu u lociranju i dokazivanju acetilacije i fosforilacije ima tehnika spektrometrija masa kojom se uz modernizaciju instrumenata i softvera mogu ostvariti značajni rezultati.

Osobit su izazov za znanstvenike PTM kod bakterija, osobito fosforilacija, kao najzastupljenija PTM kod bakterija. Istraživanja važnih bakterijskih patogena zaokuplja znanstvenike jer je dokazano da fosforilacija proteina kod bakterija utječe na različite infekcije uzrokovane bakterijama.

Sva istraživanja na području biokemije, kemije, biomedicine imaju velik izazov što prije i što detaljnije istražiti procese PTM i iskoristiti ih za dobrobit zdravlja i sprječavanja mnogih bolesti.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. David L. Nelson, Michael M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry 7th edition, W. H. Freeman & Company, New York, 2017, (75-80, 190-232, 1034-1046)
2. B. Maček, K. Forchammer, J. Hardouin, E. Weber-Ban, C. Grangeasse, I. Mijaković, Protein post-translational modification in bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, **17**(2019) 651-664
3. T. Pisithul, N. M. Patel, D. Amador – Naguez, Post-translational modifications as key regulators of bacterial metabolic fluxes, *Curr. Opin. Microbiol.*, **24** (2015), 29-37
4. P. Karšlon: Biokemija za studente kemije i medicine, Školska knjiga, Zagreb 1993., (str. 33, str.42)
5. C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto Jr., Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**(45) (2005) 7342-7372.
6. D. G. Christensen, X. Xie, N. Basisty, J. Byrnes, S. McSweeney, B. Schilling, A. J. Wolfe, Post-Translational Protein Acetylation: An Elegant Mechanism for Bacteria to Dynamically Regulate Metabolic Functions, *Front. Microbiol.*, **10**(1604) (2019)
7. Post-Translational Modifications: an overview, 13.lipnja 2017, <https://www.ptglab.com/news/blog/post-translational-modifications-an-overview/> (datum pristupa 10.travnja 2021.)
8. K. Kako, J. Dal Kima, A. Fukamizu, Emerging impacts of biological methylation on genetic information, *The Journal of Biochemistry*, **165**(1) (2019) 9-18
9. L. Karyukava, L. Krabben, M. Serebryakova, M. Veit, , S-Acylation of Proteins, *Methods Mol. Biol.*, **1934** (2019), 265-291
10. Z. Ju, J. Z. Cao, Prediction of protein N-formylation using the composition of *k*-spaced amino acid parts, *Analytical Biochemistry*, **534** (2017), 40-45.
11. C. Schaffer, P. Messner, Emerging facets of prokaryotic glycosylation, *FEMS Microbiol. Rev.*, **41** (2017), 49-91.
12. A. Drazic, L. M. Myklebust, R. Ree, T. Arnese, The world of protein acetylation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1864**(10) (2016), 1372-1401.

13. P. Shirmast, S. M. Ghafaeri, R. M. Irwin J. Abendroth, S. J. Mayclin, D. D. Lorimer, T. E. Edwards, J. K. Forwood, Structural characterization of a GNAT family acetyltransferase from *Elizabethkingia anophelis* bound to acetyl-CoA reveals a new dynamic interface, *Scientific Reports* **11**, **1274** (2021), 1-9.
14. A. AbouElfetouh, M. L. Kuhn, L. Hu, M. D. Scholle, D. J. Sorensen, A. K. Sahu, D. Becher, H. Antelmann, M. Mrkisch, W. F. Andreson, B. W. Gibson, B. Schilling, A. J. Wolfe, The E.coli sirtuin shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation substrate, *Microbiologyopen.*, **4**(1) (2015), 66-83.
15. N. Galić, M. Cindrić, Analiza proteina spektrometrijom masa, *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, **57**(5) (2008), 231-243.
16. I. Mijaković, C. Grangeasse, K. Turgay, Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems, *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**(3) (2016), 398-417
17. J. Deutscher, M. H. Saier Jr., Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria – for long time neglected, now well established, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **9** (2005), 125-131.
18. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html> (datum pristupa 15. kolovoza 2021.)
19. https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_phosphatase (datum pristupa 15. kolovoza 2021.)