Sustav Pup-proteasom: posljednja postaja u životu bakterijskih proteina

Toplak, Julia Jelena

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:757657

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički odsjek

Biološki odsjek

Julia Jelena Toplak

Sustav Pup-proteasom: posljednja postaja u životu bakterijskih proteina

Završni rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj.

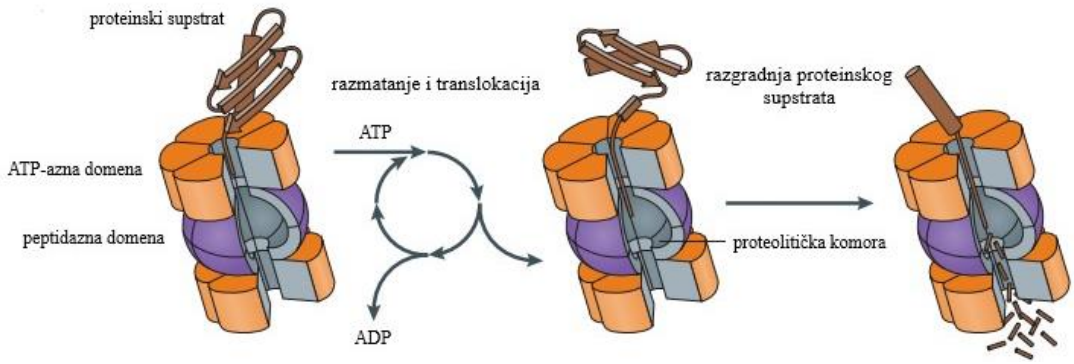
Sadržaj

1. UVOD 1
2. EUKARIOTSKI SUSTAV PROTEASOMALNE RAZGRADNJE 3
3. BAKTERIJSKI PROTEASOM 4
3.1. 20S sržna čestica proteosoma 4
3.2. Aktivatori bakterijskog proteasoma ovisni o ATP-u 8
4. PUPILACIJA PROTEINA 10
4.1. Prokariotski protein sličan ubikvitinu (Pup) 10
4.2. Vezanje proteina Pup na supstrat 12
4.3. Depupilacija i transpupilacija 15
5. SUSTAV PUP-PROTEASOM 17
5.1. Proteasomalna razgradnja pupiliranih proteina 17
5.2. Regulacija proteasomalne razgradnje 18
5.3. Alternativni proteosomalni kompleks 19
6. VAŽNOST PROTEASOMALNE RAZGRADNJE POSREDOVANE PROTEINOM PUP 20
6.1. Povezanost sustava Pup-proteasom i patogenosti bakterije *Mycobacterium tuberculosis* 20
6.2. Održavanje homeostaze metalnih iona 21
6.3. Metabolizam dušika 22
6.4. Oštećenja DNA 23
7. ZAKLJUČAK 25
8. LITERATURA 26
9. SAŽETAK 35
10. SUMMARY 36
11. ŽIVOTOPIS 37

1. UVOD

Za normalno funkcioniranje stanice ključno je održavanje funkcionalnog proteoma što omogućuju mehanizmi proteostaze. Proteostaza obuhvaća niz koordiniranih procesa koji sudjeluju u održanju homeostaze proteina, od sinteze proteina do njihovog pravilnog smatanja u kojima sudjeluju molekularni šaperoni. Osim smatanja, šaperoni sprječavaju agregiranje nesmotanih ili djelomično smotanih proteina. Naime, nepravilno smotani proteini imaju izložene hidrofobne bočne ogranke koji mogu međusobno asocirati i stvarati agregate čija je akumulacija toksična za stanicu. Iz tog razloga potrebno je ukloniti nepravilno smotane i abnormalne proteine što omogućuju putevi degradacije (Nelson i Cox, 2017; Alberts i sur., 2007). Abnormalni proteini mogu nastati kao rezultat pogreške u transkripciji ili translaciji te uslijed djelovanja reaktivnih molekula i blago denaturirajućih uvjeta u stanici, a određeni uvjeti kao što su toplinski i oksidativni stres dovode do povećanja broja oštećenih i nepravilno smotanih proteina (Goldberg, 2003).

U uklanjanju oštećenih i nepravilno smotanih proteina i kod bakterija i kod eukariota sudjeluju citosolni sustavi koji uz utrošak ATP-a razgrađuju neželjene proteine. U bakterija postoje kompartimentalizirane ATP-ovisne proteaze kao što su proteaze Lon, ClpXP i FtsH koje razgrađuju proteine. Bakterijske proteaze su AAA+ ATP-aze (engl. *ATPases associated with diverse cellular activities*), a građene su na sličan način, sadrže ATP-aznu domenu i peptidaznu domenu. Proces razgradnje proteina bakterijskim proteazama odvija se u tri koraka (slika 1.). Prvi korak je prepoznavanje i vezanje supstrata, nepravilno smotanog proteina, koji se zatim razmata i translocira u proteolitičku komoru koju čini peptidazna domena. Razmatanje i translokacija proteina zahtijevaju hidrolizu ATP-a. Zadnji korak je razgradnja proteina unutar proteolitičke komore čime nastaju peptidi koje ATP-neovisne proteaze mogu razgraditi do aminokiselina (Gur i sur., 2011; Nelson i Cox, 2017; Mahmoud i Chien, 2018). Bakterijske proteaze prepoznaju različite proteinske supstrate pa tako proteaza Lon ima široki spektar supstrata i prepoznaje izložene hidrofobne ogranke različitih proteina. Nasuprot tome, proteaza ClpXP je selektivnija i prepoznaje specifične sekvence proteina koje služe kao oznaka za degradaciju. (Nelson i Cox, 2017; Mahmoud i Chien, 2018).



Slika 1. Razgradnja proteina bakterijskim proteazama ovisnima o ATP-u. Bakterije posjeduju kompartimentalizirane proteaze građene od ATP-azne i peptidazne domene koje uz utrošak ATP-a razgrađuju nepravilno smotane proteine. Proces se odvija u tri koraka: prepoznavanje proteinskog supstrata, razmatanje proteina i translokacija u proteolitičku komoru te degradacija proteinskog supstrata unutar proteolitičke komore. Preuzeto i prilagođeno prema Gur i sur., 2011.

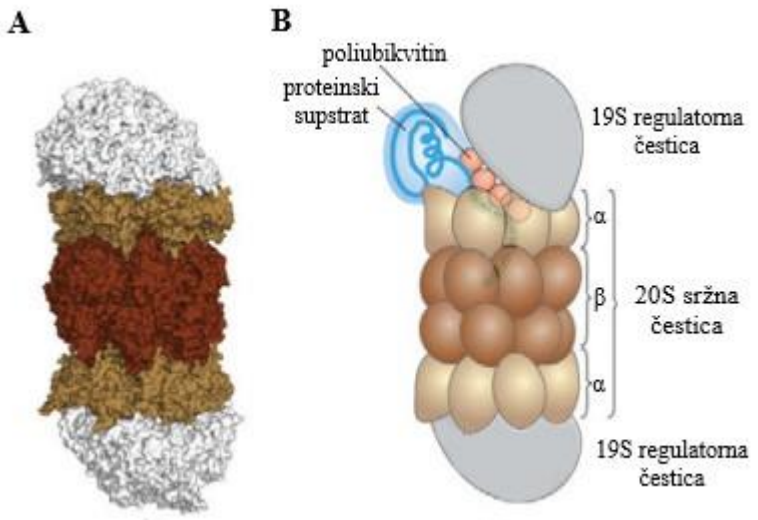
Proteasomalna razgradnja glavni je sustav za eliminaciju neželjenih proteina u eukariota, dok je kod bakterija ograničena na skupinu aktinobakterija (Tamura i sur., 1995; Lupas i Baumeister, 1994). Eukariotski i bakterijski proteasomalni sustav razlikuju se u načinu obilježavanja proteina za degradaciju. Ubikvitin je mali protein koji se veže na ciljni protein i usmjerava ga u razgradnju u 26S proteasom (Nelson i Cox, 2017). Aktinobakterijski analog ubikvitinu je protein Pup (engl. *prokaryotic ubiquitin like protein*) koji u reakciji pupilacije stvara izopeptidnu vezu s proteinom koji kasnije biva razgrađen u proteasomu (Pearce i sur., 2008). Za razliku od eukariota kod kojih je sustav proteasomalne degradacije esencijalan, aktinobakterije koje posjeduju defektan proteasom, vijabilne su (Knipfer i Shrader, 1997). Ipak, sustav Pup-proteasom omogućuje nekim bakterijama preživljavanje nepovoljnih uvjeta (vidi poglavlje 6.). Osim usmjeravanja proteina u proteasomalnu razgradnju, pupilacija kao oblik posttranslacijske modifikacije ima i druge funkcije u bakterija primjerice u održavanju homeostaze metalnih iona i regulaciji metabolizma dušika što je opisano u poglavljima 6.2. i 6.3.

2. EUKARIOTSKI SUSTAV PROTEASOMALNE RAZGRADNJE

Glavni eukariotski put razgradnje proteina je degradacija u 26S proteasomu, proteinskom kompleksu bačvastog oblika koji uz utrošak ATP-a eliminira neželjene i nefunkcionalne stanične proteine. U eukariota, proteini usmjereni u proteasomalnu razgradnju obilježeni su poliubikvitinskim biljegom. Ubikvitin je mali protein građen od 76 aminokiselina i odlikuje ga visok stupanj očuvanosti u cijeloj domeni eukariota. Kao oblik posttranslacijske modifikacije, ubikvitin se karboksilnom skupinom terminalnog glicina kovalentno veže za lizinski bočni ogranak proteina u procesu koji zahtijeva ATP i tri enzima: aktivirajući enzim E1, konjugirajući enzim E2 i ligazu E3. Poliubikvitinski lanci nastaju djelovanjem enzima E3 pri čemu nastaje izopeptidna veza između Lys48 molekule ubikvitina i karboksilne skupine sljedeće molekule ubikvitina. Najmanje četiri molekule ubikvitina moraju biti u obliku poliubikvitinskog lanca vezane na protein kako bi proteinski supstrat mogao interagirati s proteasomom (Cox i Nelson, 2017; Voet i Voet, 2011).

Eukariotski 26S proteasom građen je od 20S sržne čestice koja predstavlja katalitičku srž proteasoma i od 19S regulatornih čestica koje se nalaze na polovima 20S sržne čestice (slika 2.). Sržnu česticu eukariotskog proteasoma čine četiri heptamerna prstena, dva vanjska prstena građena od α-podjedinica i dva unutarnja prstena građena od β-podjedinica. Unutarnji prstenovi grade središnju komoru 20S sržne čestice u kojoj se razgrađuju ciljni proteini. Središnja komora izgrađena je od različitih β-podjedinica od čega su tri β-podjedinice u svakom prstenu katalitički aktivne, a razlikuju se u supstratnoj specifičnosti što je posljedica različitih veznih mjesta za proteinski supstrat (Cox i Nelson, 2017; Voet i Voet, 2011).

Kako bi proteini usmjereni u razgradnju ušli u središnju komoru proteasoma prvo se moraju razmotati što omogućuju dvije 19S regulatorne čestice koje su poput kapa smještene na krajevima 20S sržne čestice. Građene su od podjedinica koje prepoznaju i vežu supstrate te heksamernog prstena koji pripada u skupinu AAA+ ATP-aza. Prsten uz utrošak ATP-a razmata protein i usmjerava ga u centar 20S sržne čestice. Osim toga, 19S regulatorne čestice deubikvitiniraju proteinski supstrat (Nelson i Cox, 2017).



Slika 2. Struktura eukariotskog 26S proteasoma. (A) 19S regulatorne čestice (sivo) smještene su na polovima 20S sržne čestice proteasoma (smeđe). (B) 20S sržnu česticu čine dva unutarnja β-prstenova i dva vanjska α-prstenova. Poliubikvitinirani proteinski supstrat prepoznaju i razmotavaju 19S regulatorne čestice, a zatim se razgrađuje unutar sržne čestice. Preuzeto i prilagođeno prema Nelson i Cox, 2017.

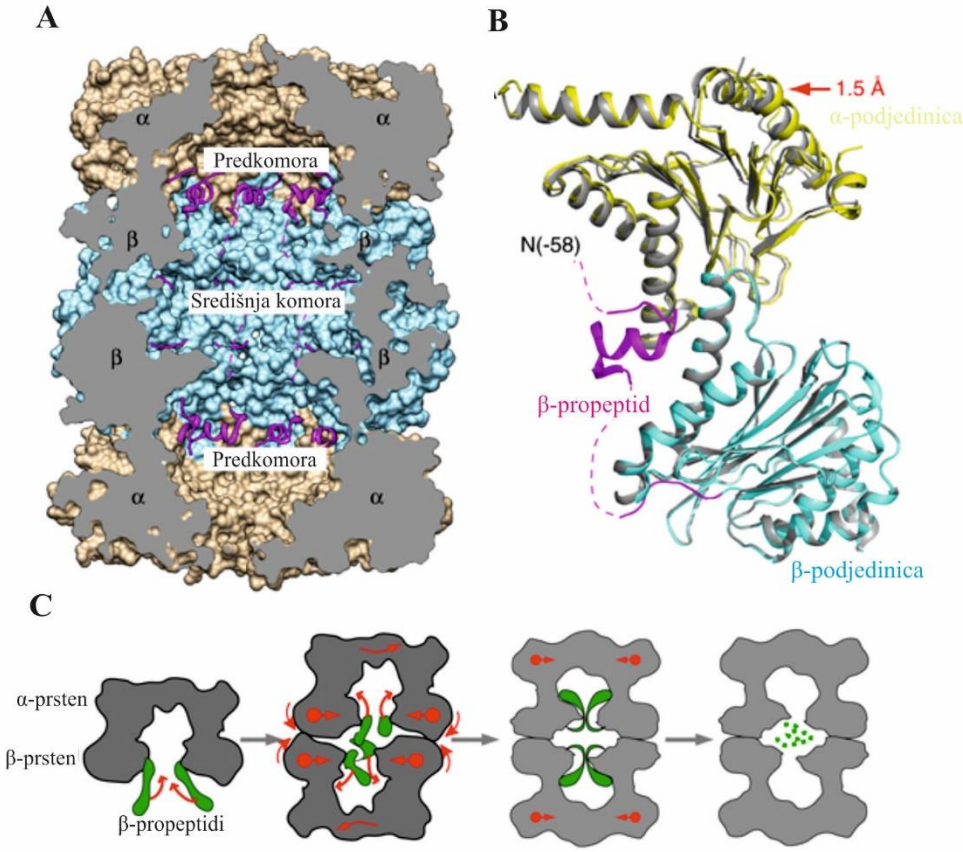
3. BAKTERIJSKI PROTEASOM

Za razliku od eukariota i arheja kod kojih proteasomalna razgradnja ima središnju ulogu u proteostazi, kod bakterija 20S proteasom prisutan je samo u redovima *Actinomycetales* i *Nitrospirales* gdje koegzistira sa sustavom proteaza (Tamura i sur., 1995; Lupas i sur., 1994). Ne postoji jedinstvena teorija o podrijetlu bakterijskog 20S proteasoma. Moguće je da su geni koji kodiraju za 20S proteasom u skupinama *Actinomycetales* i *Nitrospirales* dobiveni horizontalnim prijenosom iz arheja ili eukariota (Volker i Lupas, 2002). Drugo je pak stajalište da je bakterijski proteasom predački oblik arhejskog i eukariotskog proteasoma (Valas i Bourne, 2008).

3.1. 20S sržna čestica proteosoma

Minimalni proteasom u sve tri domene dijeli zajedničku građu. Dva unutarnja prstena sastavljena svaki od po sedam β-podjedinica omeđena su vanjskim heptamernim α-prstenovima. U građi proteasoma uočavaju se tri komore. Dvije predkomore nalaze se s gornje i donje strane proteasoma i omeđuju ih α-prsten i β-prsten. Središnju komoru omeđuju β-prstenovi. Ulogu zaštitara imaju α-prstenovi koji nadziru ulaz proteinskih supstrata u unutarnji dio proteasoma gdje β-podjedinice provode proteolitičku reakciju (Groll i sur., 1997; Löwe i sur. 1995; Tamura i sur. 1995).

Za razliku od eukariota čiju 20S sržnu česticu odlikuju heteromerni prstenovi od sedam različitih podjedinica, većinu arhejskih i bakterijskih 20S proteasoma grade prstenovi od sedam jednakih α- odnosno β-podjedinica (slika 3. A i 3. B). Za sklapanje heptamernih prstenova i 20S sržne čestice nisu potrebni dodatni faktori po čemu se bakterijski proteasom razlikuje od eukariotskog. Naime, u eukariota posebni šaperoni interagiraju s α- i β-podjedinicama i omogućuju sastavljanje 20S proteasoma (Hirano i sur., 2006; Pouch i sur., 2000). Bakterijske β-podjedinice sintetiziraju se u prekursorskom obliku koji na svojem N-kraju sadrži β-propeptid čijim odcjepljivanjem nastaje zrela β-podjedinica (slika 3. B). U roda *Rhodococcus* propeptid omogućuje smatanje β-podjedinice i djeluje kao molekularni šaperon tako što ostvaruje specifične interakcije s oba tipa podjedinica te omogućuje povezivanje β-podjedinice s dvije susjedne α-podjedinice. Na taj način ostvaruje se dovoljno velika kontaktna površina koja omogućuje povezivanje podjedinica u prstenove. Smatra se da ovakva povezanost sastavljanja α-prstenova i β-prstenova omogućuje aktivaciju β-podjedinica tek kad je 20S proteasom cjelovit. Zadnji korak u sklapanju holoproteasoma predstavlja odcjepljivanje β-propeptida (Zühl i sur., 1997; Kwon i sur. 2004). Suprotno djelovanje β-propeptida, pri čemu propeptid djeluje inhibitorno na sastavljanje, opaženo je prilikom sklapanja 20S sržne čestice proteasoma vrste *Mycobacterium tuberculosis* (slika 3. C). Autokatalitičko cijepanje β-propeptida predstavlja barijeru (termodinamsku ili kinetičku) tijekom sastavljanja proteasoma koja se može prevladati uklanjanjem β-propeptida ili povišenjem temperature što je pokazano u sojevima bakterije *Escherichia coli* s deletiranim β-propeptidom. U odsustvu propeptida bakterijski se proteasom mogao formirati i pri nižim temperaturama. Razlika u sklapanju holoproteasoma proizlazi iz različite orijentacije propeptida. U 20S proteasomu iz bakterije roda *Rhodococcus* β-propeptid se nalazi na sučelju dviju podjedinica, dok u proteasomu bakterije *M. tuberculosis* strši iz polovice proteasoma te se mora premjestiti u unutrašnjost 20S sržne čestice (Lin i sur. 2006; Li i sur. 2010).

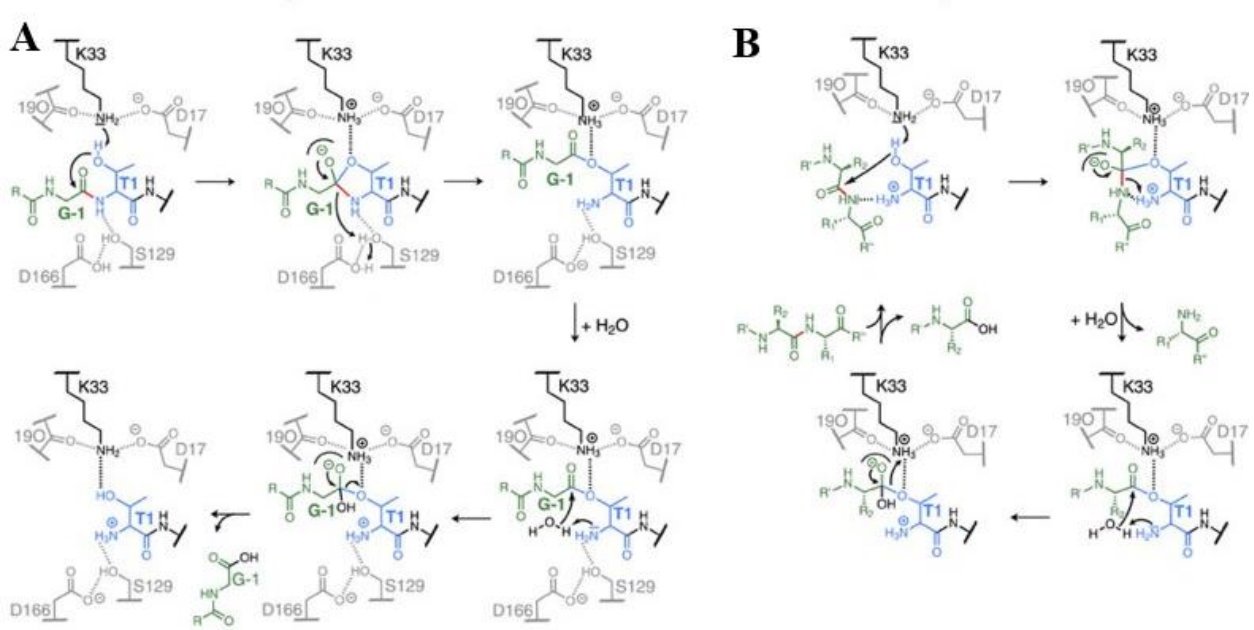


Slika 3. Struktura 20S sržne čestice proteasoma bakterije *M. tuberculosis*. (A) Presjek 20S proteasoma na kojem se razlikuju predkomora i središnja komora. (B) Proteasom je građen od α-podjedinica (žuto) i β-podjedinica (plavo). Ružičastom bojom označen je β-propeptid. (C) Promjene koje prate sastavljanje holoproteasoma. Preuzeto i prilagođeno prema Li i sur., 2010.

Hidrolitičkim cijepanjem peptidne veze oslobađa se β-propeptid i izlaže se treoninski ostatak (Thr1) što čini β-podjedinicu katalitički aktivnom (slika 4. A). Autoliza je posredovana lizinskim bočnim ogrankom koji djeluje kao baza i deprotonira hidroksilnu skupinu Thr1. Kisik bočnog ogranka treonina nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom glicina na poziciji -1 i nastaje tetraedarski intermedijer. Nakon raspada intermedijera nastaje acil-enzim međuprodukt. Slijedi nukleofilni napad vode na karbonilni ugljik Gly(-1) potpomognut deprotonacijom vode od strane amino-skupine Thr1. Produkt je propeptid koji disocira te je protonirani treonin spreman za proteolizu.

Katalitičku trijadu u aktivnom mjestu proteasoma čine Thr1, Lys33 i Asp17. Smatra se da je trijada očuvana u 20S proteasomu u sve tri domene života. Lizin djeluje kao baza i deprotonira Thr1 koji zatim može napasti karbonilni ugljikov atom supstrata, dok Asp17 mijenja pK_a ogranka Lys33 čineći ga boljom bazom. Kao i autokatalitičko cijepanje, proteoliza uključuje nastajanje

acil-enzima i njegovu hidrolizu čime se oslobađa acilni produkt i regenerira treonin u aktivnom mjestu (slika 4. B). Zbog ovakvog aktivnog mjesta i katalitičkog mehanizma proteasom se svrstava u N-terminalne nukleofilne hidrolaze (Huber i sur., 2016; Lin i sur. 2006).



Slika 4. Reakcijski mehanizam degradacije unutar aktivnog mjesta proteasoma. (A) Autolitička reakcija procesiranja β-propeptida. (B) Katalitički mehanizam proteolize. Preuzeto i prilagođeno prema Huber i sur., 2016.

Kako je središnja komora eukariotskog proteasoma izgrađena od različitih β-podjedinica, u unutrašnjosti su smještena aktivna mjesta koja se razlikuju u supstratnoj specifičnosti (Voet i Voet, 2011). Kod bakterija koje sadrže proteasom, β-podjedinica je kodirana jednim genom. Tako je proteasom bakterija iz rodova *Rhodococcus* i *Frankia* zbog jednog tipa veznog mjesta specifičan samo za jedan tip supstrata. Njegovo vezno mjesto grade hidrofobne aminokiseline zbog čega supstratnom specifičnošću nalikuje na kimotripsin odnosno hidrolizira peptidnu vezu koja slijedi nakon hidrofobnog aminokiselinskog ostatka (Tamura i sur., 1995; Pouch i sur., 2000.). Aktivno mjesto proteasoma vrste *M. tuberculosis* prepoznaje različite supstrate iako je središnja komora izgrađena od jednog tipa β-podjedinice što proizlazi iz posebne arhitekture aktivnog mjesta. Gornju površinu veznog mjesta čine hidrofobne aminokiseline, a donju površinu hidrofilne aminokiseline što omogućuje razgradnju hidrofobnih, kiselih i bazičnih peptida unutar jednog aktivnog mjesta (Hu i sur. 2006).

3.2. Aktivatori bakterijskog proteasoma ovisni o ATP-u

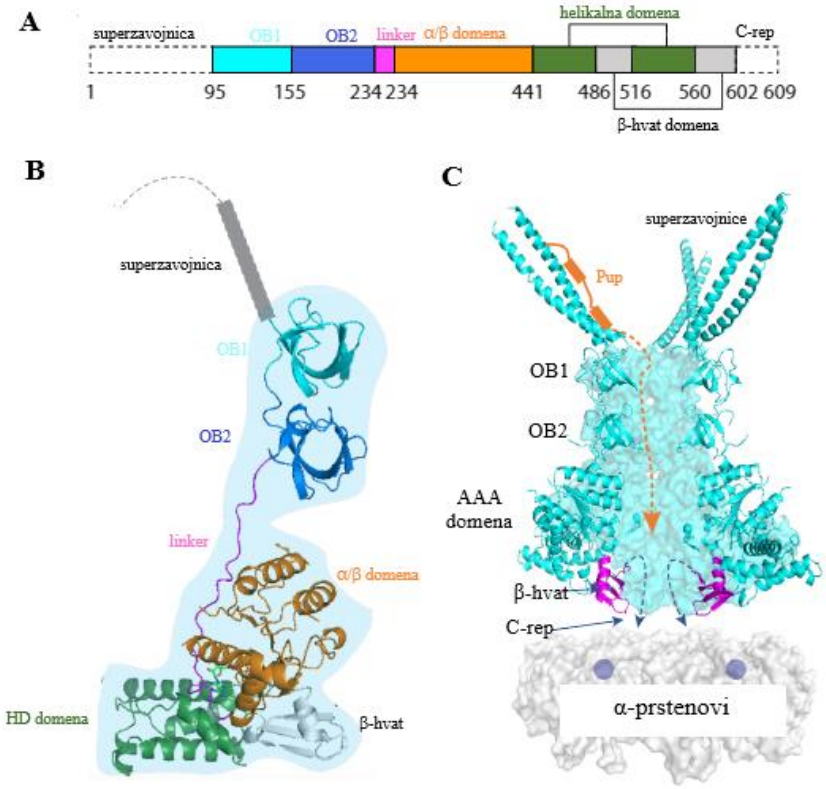
Kako bi proteini usmjereni u razgradnju ušli u središnju komoru proteasoma prvo se moraju razmotati. Kao što je već rečeno, eukariotskom proteasomu u tome pomažu 19S regulatorne čestice, AAA+ ATP-aze koje uz utrošak ATP-a razmataju protein i translociraju ga u katalitičku srž proteasoma (Nelson i Cox, 2017).

AAA+ ATP-aze pripadaju NTP-azama s P-petljom. Svi proteini s AAA+ domenama sadrže određene strukturne motive specifične za tu proteinsku porodicu, a to su Walker-A i Walker-B motivi, druga regija homologije SRH (engl. *second region of homology*) i regija senzor-2. Motivi Walker-A i Walker-B grade P-petlju koja veže i hidrolizira ATP. Druga regija homologije sadrži dva strukturna motiva, senzor-1 i argininski prst, koji koordiniraju hidrolizu ATP-a te omogućuju konformacijsku promjenu tijekom hidrolize. Konformacijsku promjenu potpomaže i motiv senzor-2 tako što ostvaruje interakcije s α-fosfatom ATP-a. Uz ATP-aznu domenu, proteasomalni aktivatori sadrže i N-terminalnu domenu koja veže supstrat (Neuwald i sur., st1999; Djuranovic i sur., 2009).

U bakterija su također prisutne AAA+ ATP-aze koje asociraju u heksamerni prsten i omogućuju ATP-ovisnu aktivaciju proteasoma. Okarakterizirana je ATP-aza Mpa (engl. *mycobacterial proteasome ATPase*) iz bakterije *M. tuberculosis*, u drugih aktinobakterija poznata kao ARC (engl. *AAA ATPase forming ring-shaped complexes*), i protein Cpa (engl. *Cdc48-like protein of actinobacteria*), aktinobakterijska ATP-aza slična proteinu Cdc48 (Wolf i sur., 1998; Darwin i sur., 2005; Ziemski i sur., 2018).

Proteini Mpa iz vrste *M. tuberculosis* i ARC iz vrste *Rhodococcus erythropolis* ortolozi su koji su građeni slično kao i aktivatori proteasoma iz drugih domena života. U strukturi monomera Mpa/ARC razlikuju se sljedeće domene: N-terminalna α-zavojnica, međudomena, ATP-azna domena i domena β-hvat (slika 5.). Zavojnice dvaju susjednih monomera čine superzavojnicu i tri superzavojnice jednog Mpa/ARC heksamera interagiraju s pupiliranim proteinskim supstratom. Međudomena je veličine oko 150 aminokiselina i sastoji se od dvije subdomene s oligosaharid-vezujućim motivom. Ovaj strukturni motiv čini β-bačva sastavljena od pet β-lanaca i značajan je faktor stabilizacije heksamera Mpa. Međudomenu slijedi ATP-azna domena sastavljena od veće α/β subdomene i manje α-helikalne subdomene. Domena β-hvat nalazi se na C-terminalnom dijelu proteina Mpa i onemogućava slijedu GQYL interakciju s 20S sržnom česticom proteasoma.

Naime, C-kraj Mpa aktivatora interagira s 20S proteasomom uslijed čega se otvara ulaz u središnju komoru i omogućuje degradacija proteina, a interakcija se može ostvariti tek nakon konformacijske promjene kojom se domena β-hvat repozicionira tako da više ne zaklanja slijed GQYL što je detaljnije opisano u poglavlju 5.1. (Darwin i sur., 2005; Wang i sur., 2009; Wu i sur., 2017).



Slika 5. Proteasomalni aktivator Mpa. (A) Organizacija domena proteina Mpa. (B) Struktura aktivatora Mpa na kojoj se razlikuju dvije subdomene s oligosaharid-vezujućim motivom (plavo) koje su linkerom (ružičasto) povezane s α/β subdomenom (narančasto) nakon koje slijedi helikalna domena (zeleno) i β-hvat (sivo). (C) Interakcija proteina Mpa s α-prstenovima 20S sržne čestice proteasoma. Preuzeto i prilagođeno prema Yin i sur., 2021.

Protein Cpa također može interagirati sa 20S sržnom česticom proteasoma i uz utrošak ATP-a aktivirati proteasom, a radi se o homologu eukariotskog proteina Cdc48. Protein Cdc48 uključen je u različite stanične procese kao što su regulacija staničnog ciklusa, razgradnja proteina, autofagija, apoptoza, a njegov arhejski homolog veže se na 20S proteasom i omogućuje razmatanje proteina i njihov ulazak u središte proteasoma (Baek i sur., 2013; Barthelme i sur., 2014). Kao i aktivator Mpa, protein Cpa stvara heksamernu strukturu i to u prisustvu ATP-a, a oligomerizaciju potpomaže niska ionska jakost. Pokusi *in vitro* pokazali su da protein Cpa ostvaruje interakcije s 20S proteasomom, a njegovu uključenost u proteasomalnu degradaciju proteina podupire i činjenica da je gen *cpa* pronađen samo u genomima aktinobakterija koje sadrže i gene koji kodiraju

za podjedinice 20S sržne čestice proteasoma. Pokazano je da protein Cpa sudjeluje u prilagodbi na stresne uvjete posebice u uvjetima starvacije ugljikom, a promjene u proteomu tijekom starvacije impliciraju da protein Cpa kroz promjenu količine ribosomalnih proteina u stanici dovodi do smanjenje stope translacije i sintetiziranih proteina. Ipak, potrebna su daljna istraživanja kako bi se utvrdila povezanost proteina Cpa i proteasoma te na koji način protein Cpa u uvjetima starvacije utječe na remodeliranje ribosoma (Ziemski i sur., 2018).

4. PUPILACIJA PROTEINA

Prokarioti u svrhu usmjeravanja proteina u proteasomalnu razgradnju ne koriste ubikvitin, već prokariotski ubikvitinu sličan protein Pup. Da je protein Pup uključen u održanje proteostaze kod skupine Actinobacteria, primijećeno je tijekom analize proteinskih interakcija koje ostvaruje aktivator proteasoma Mpa u bakteriji *M. tuberculosis*. Pomoću sustava dvaju hibrida zabilježeno je da protein Pup ostvaruje specifične interakcije s aktivatorom Mpa, a uočeno je i da se protein Pup kovalentno veže na malonil-acetil-CoA-ACP-transacetilazu koja je supstrat proteasoma. Zaključeno je da protein Pup služi kao signal za proteasomalnu degradaciju tako što se kovalentno veže za specifični lizinski bočni ogranak supstrata za proteolizu (Pearce i sur., 2008).

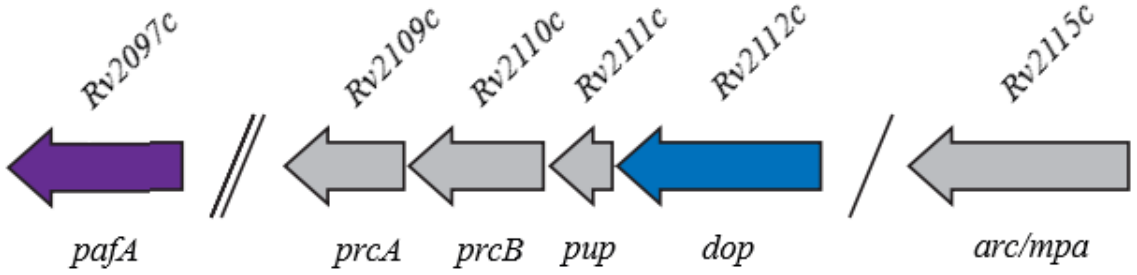
4.1. Prokariotski protein sličan ubikvitinu (Pup)

Protein Pup građen je od 64 aminokiselina i svojom funkcijom podsjeća na ubikvitin čemu duguje ime. Unatoč sličnoj ulozi koju ta dva proteina obavljaju u održanju proteastaze, prokariotski i eukariotski ubikvitinu slični proteini dijele samo 12-14 % sličnosti u sekvenci. Filogenetske analize pokazale su da porodica proteina Pup čini jedinstvenu evolucijsku granu izdvojenu od ostalih proteina sličnih ubikvitinu. Protein Pup također u strukturi ne sadrži motiv β-hvat koji je obilježje ubikvitina i proteina sličnih ubikvitinu već je intrinzično neuređen protein. U svojoj primarnoj strukturi protein Pup sadrži velik broj polarnih aminokiselina i mali broj hidrofobnih aminokiselina te zbog elektrostatskog odbijanja i nedostatka hidrofobnog efekta koji bi vodio proces smatanja protein ne može poprimiti definiranu tercijarnu strukturu (Liao i sur., 2009; Chen i sur., 2009). Kao i drugi intrinzično neuređeni proteini, protein Pup u interakciji s proteinskim partnerima poprima definiranu strukturu. Takav prijelaz iz neuređenog u uređeno stanje zabilježeno je tijekom vezanja proteina Pup na ATP-azu Mpa, deamidazu Dop i ligazu PafA (Wang i sur., 2010; Barandun i sur., 2013; Özcelik i sur., 2012).

Protein Pup sadrži na C-kraju diglicinski slijed koji je i očuvan u gotovo svim proteinima sličnim ubikvitinu, no kod proteina Pup poslije diglicinskog motiva dolazi glutamin ili glutamat. Na važnost tog slijeda na C-kraju ukazuje i visok stupanj očuvanosti slijeda među proteinima Pup iz različitih vrsta iz skupine Actinobacteria. Karakterizacijom mutanata kojim je deletiran diglicinski slijed ili C-terminalni glutamin utvrđeno je da ne dolazi do vezanja proteina Pup na proteine što znači da kovalentno vezanje proteina Pup na proteinske supstrate ovisi o diglicinskom motivu i glutaminu na C-kraju (Pearce i sur., 2008; Burns i sur., 2009).

Za razliku od ubikvitina koji prije konjugacije prolazi kroz procesiranje kojim se odcjepljuju aminokiselinski ostaci na C-kraju kako bi se oslobodio diglicinski slijed na karboksilnom kraju proteina, analiza pupiliranih proteina spektrometrijom masa pokazala je da se glutamin na C-kraju proteina Pup ne odcjepljuje već dolazi do deamidacije te pritom nastaje glutamat koji zatim stvara izopeptidnu vezu s ε-amino skupinom lizinskog bočnog ogranka ciljnog proteina (Pearce i sur., 2008; Burns i sur., 2009).

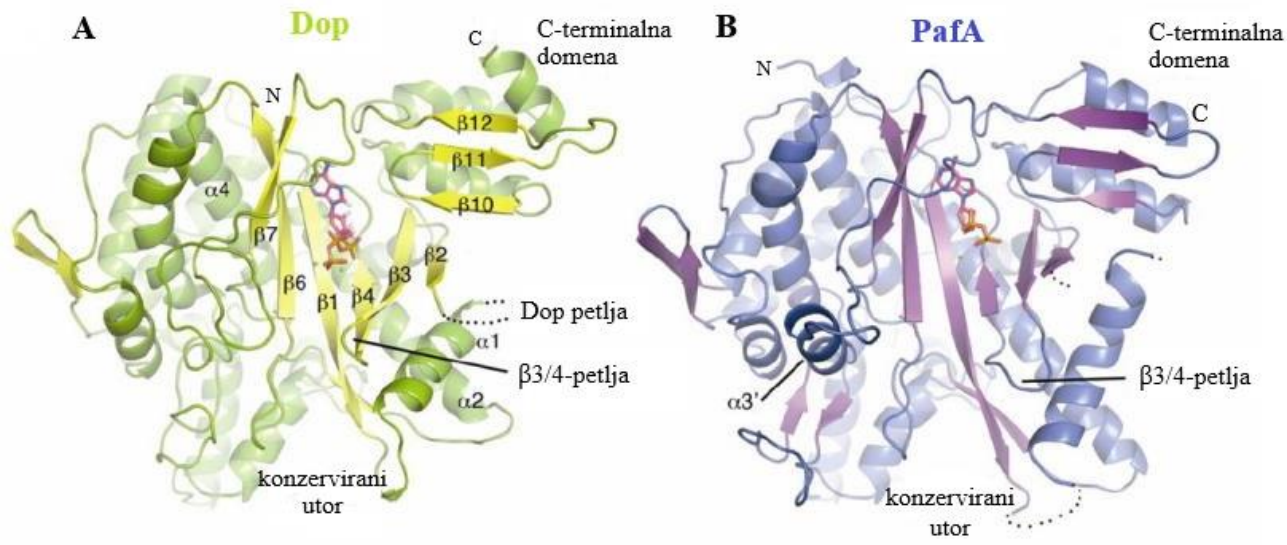
Deamidaciju provodi deamidaza proteina Pup nazvana Dop (engl. *deamidase of Pup*), a ligaza PafA (engl. *proteasome accessory factor A*) katalizira nukleofilni napad ε-amino skupine lizinskog bočnog ogranka proteinskog supstrata na aktiviranu karboksilnu skupinu C-terminalnog glutamata proteina Pup. Osim deamidacije, enzim Dop provodi i reakciju depupilacije kojom se protein Pup uklanja sa ciljnog proteina zbog čega se ovaj enzim naziva i depupilaza Dop (vidi poglavlje 4.3.). U genomu bakterije *M. tuberculosis* geni *dop* i *pafA* grupirani su zajedno s drugim genima uključenima u proteasomalnu razgradnju (slika 6.) što također sugerira da su proteini Dop i PafA uključeni u pupilaciju (Striebel i sur., 2009).



Slika 6. Organizacija gena uključenih u proteasomalnu razgradnju u bakterije *M. tuberculosis*. Gen *pafA* kodira za ligazu PafA, a gen *dop* za deamidazu Dop. Produkti gena prcA i prcB su α-podjedinice odnosno β- podjedinice proteasoma. Protein Pup kodiran je genom *pup*, a aktivator proteasoma Mpa genom *arc/mpa*. Preuzeto i prilagođeno prema Striebel i sur., 2009.

4.2. Vezanje proteina Pup na supstrat

Pupilacija se sastoji od dva koraka, deamidacije i konjugacije, koja provode enzimi Dop i PafA koji pripadaju skupini karboksilat-amin ligaza. Iako kataliziraju različite reakcije, ova dva globularna proteina pokazuju visok stupanj homologije. U strukturi proteina razlikuju se dvije domene, veća N-terminalna domena i manja C-terminalna domena (slika 7.). Unutar N-terminalne domene šest antiparalelnih β-lanaca čini udubljenu β-ploču koja se naziva i β-kolijevka u kojoj je smješteno aktivno mjesto enzima. Dok je N-terminalna domena zajednička svim enzimima iz skupine karboksilat-amin ligaza, C-terminalna domena koju gradi β-ploča od 3 lanca i 2-3 α-zavojnice jedinstveno je obilježje za proteine Dop i PafA (Özcelik i sur., 2012; Barandun i sur., 2013). Enzim Dop koristi ATP kao kofaktor, ali ne hidrolizira ATP po svakoj reakciji deamidacije dok PafA troši jednu molekulu ATP-a za svaki katalitički ciklus (Striebel i sur., 2009). Vezno mjesto za ATP nalazi se na zatvorenom kraju β-kolijevke. Smještanje α-, β-, i γ-fosfata ATP-a omogućuju tri argininska bočna ogranka te magnezijev ion koordiniran konzerviranim glutamatom (Özcelik i sur., 2012).



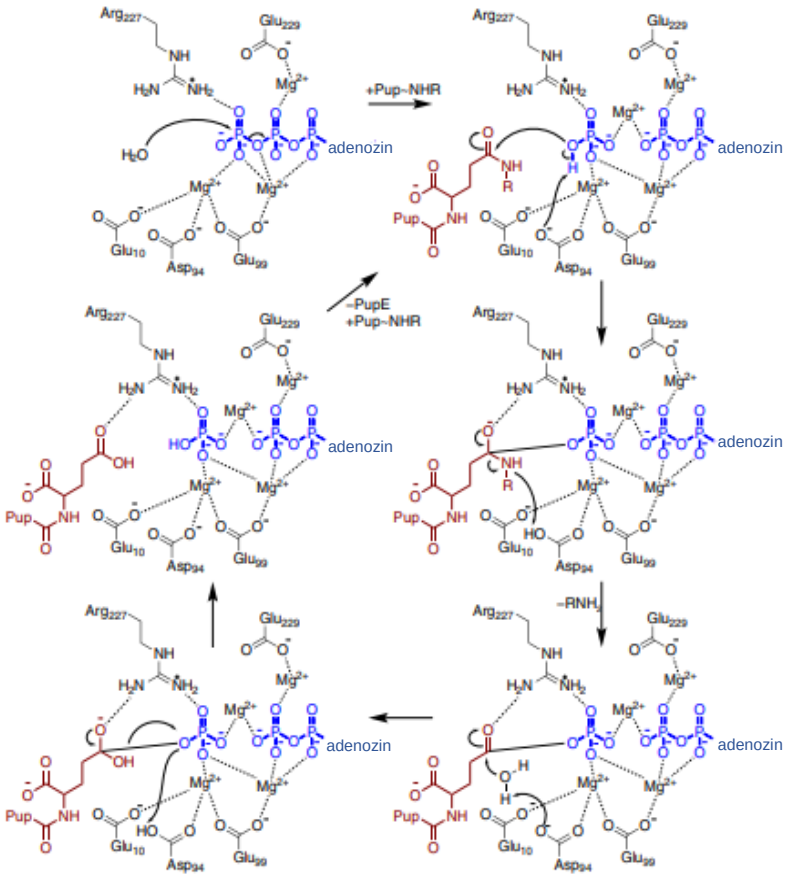
Slika 7. Kristalna struktura deamidaze Dop iz bakterije *Acidothermus cellulolyticus* (A) i ligaze PafA iz bakterije *Corynebacterium glutamicum* (B). Preuzeto i prilagođeno prema Özcelik i sur., 2012.

Svojstvo koje se javlja u strukturi ostalih karboksilat-amin ligaza pa tako i u proteina Dop i PafA je konzervirani utor. Kod glutamin-sintetaze taj utor predstavlja vezno mjesto za supstrat, glutamat, pri čemu α-karboksilna skupina glutamata ostvaruje interakcije s konzerviranim

argininskim bočnim ogrankom. Isti arginin nalazi se na odgovarajućoj poziciji u utoru proteina Dop i PafA što daje naslutiti da bi se na jednak način protein Pup mogao sa svojim C-terminalnim glutaminom odnosno glutamatom pozicionirati u konzerviranom utoru enzima Dop i PafA. Riješena kristalna struktura kompleksa PafA-Pup potvrdila je da se protein Pup veže u konzervirani utor ligaze PafA i pritom dolazi do prijelaza proteina Pup iz neuređenog u uređeno stanje kojeg čine dvije zavojnice povezane linkerom (Özcelik i sur., 2012; Barandun i sur., 2013).

U prvom koraku pupilacije, deamidaza Dop katalizira nukleofilni napad molekule vode na karbonilni ugljik C-terminalnog glutamina proteina Pup pri čemu se oslobađa amonijak (slika 8.). Kako bi se reakcija deamidacije mogla odvijati, potrebna je hidroliza ATP-a, a u prisutnosti nehidrolizabilnih analoga ATP-a reakcija se ne događa. Hidrolizom ATP-a nastaju ADP i anorganski fosfat koji ostaju vezani u aktivnom mjestu i sudjeluju u sljedećim krugovima katalize. Kad ADP i anorganski fosfat disociraju, potrebna je hidroliza nove molekule ATP-a kako bi se mogla dalje provoditi reakcija deamidacije. Dodatkom samo ADP-a ne dolazi do deamidacije odnosno depupilacije, dakle anorganski fosfat ključan je za katalizu (Bolten i sur., 2017).

Predloženi mehanizam reakcije odvija se preko fosfo-Pup intermedijera. Nukleofilnim napadom kisika anorganskog fosfata na karbonilni ugljik bočnog ogranka terminalnog glutamina nastaje tranzijentni međuprodukt. Amonijak disocira, a intermedijer se hidrolizira te se oslobađa protein Pup s terminalnim glutamatom, a u aktivnom mjestu enzima ostaje anorganski fosfat. Važnu ulogu u reakciji ima Asp-94 koji aktivira vodu za nukleofilni napad. Kako bi došlo do same reakcije deamidacije potrebni su ADP i anorganski fosfat, ali oni ne nastaju u odsutnosti proteina Pup. Tek kad se veže supstrat Pup u aktivnom mjestu može doći do aktivacije molekule vode za nukleofilni napad i hidrolize ATP-a što sprječava trošenje ATP-a u uvjetima kad se u aktivnom mjestu enzima Dop ne nalazi supstrat (Bolten i sur., 2017).



Slika 8. Pretpostavljeni reakcijski mehanizam deamidaze/depupilaze Dop. Enzim Dop osim reakcije deamidacije proteina Pup katalizira i reakciju depupilaciju u kojoj se protein Pup odcjepljuje s pupiliranog proteinskog supstrata. Na slici je prikazan mehanizam depupilacije koji je jednak mehanizmu reakcije deamidacije, ali se reakcije razlikuju u supstratima. Preuzeto i prilagođeno prema Bolten i sur., 2017.

Drugi predloženi mehanizam reakcija deamidacije odvija se preko kovalentnog intermedijera koji nastaje nukleofilnim napadom tog spomenutog aspartata na amidnu vezu terminalnog glutamina proteina Pup te bi se prema tome enzim Dop svojim katalitičkim mehanizmom razlikovao od ostalih pripadnika skupine karboksilat-amin ligaza (Burns i sur., 2012). Ipak, kako deamidaza Dop pokazuje visok stupanj homologije u strukturi s ostalim enzimima iz skupine karboksilat-amin ligaza za očekivati je da je i mehanizam reakcije sličan i da uključuje anorganski fosfat što podupiru biokemijska istraživanja i mutacijske analize enzima Dop (Bolten i sur., 2017).

Drugi korak reakcije pupilacije katalizira ligaza PafA. Dolazi do stvaranja izopeptidne veze između ciljnog proteina i proteina Pup pri čemu se troši ATP. U koraku aktivacije odvija se

nukleofilni napad γ-karboksilne skupine C-terminalnog glutamata na γ-atom fosfora ATP-a te pritom nastaje miješani anhidrid Pup-γ-glutamil fosfat. Nastali intermedijer i ADP ostaju vezani u aktivnom mjestu. Reakcija aktivacije odvija se i u odsutnosti proteinskog supstrata i predstavlja reakciju koja uvjetuje brzinu ukupne reakcije. Nakon stvaranja aktiviranog intermedijera slijedi nukleofilni napad ε-amino skupine lizina ciljnog proteina i nastanka izopeptidne veze. Pretpostavlja se da u aktivaciji bočnog ogranka lizina za nukleofilni napad sudjeluje očuvani ogranak Asp-94 (Guth i sur., 2011; Striebel i sur., 2009).

Ligaza PafA može i sama biti pupilirana odnosno polipupilirana. Bočni ogranak Lys-320 mjesto je pupilacije ligaze PafA iz bakterije *Mycobacterium smegmatis*, a reakcija se odvija u dva stupnja. Intermolekulskom reakcijom protein PafA biva monopupiliran od strane druge molekule PafA, a zatim se polipupilacija odvija autokatalitičkim mehanizmom. U sojevima *M. smegmatis* s deletiranim genom koji kodira za podjedinice 20S proteasoma, protein PafA je stabilniji što sugerira da bi stanična razina enzima PafA mogla biti regulirana polipupilacijom. Moguće je da se radi o mehanizmu negativne povratne sprege koji se uključuje u uvjetima niske koncentracije proteinskog supstrata ili deamidaze Dop kako bi se sprječilo nekontrolirano pupiliranje i usmjeravanje staničnih proteina u proteasomalnu razgradnju (Elharar i sur., 2014; Chen i sur., 2016).

4.3. Depupilacija i transpupilacija

Neke bakterije kodiraju za protein Pup koji na svojem C-kraju imaju glutamat (Pup_{Glu}) pa u tom slučaju za konjugaciju sa ciljnim proteinom nije potrebna prethodna deamidacija pomoću enzima Dop. Ipak, gotovo svi organizmi koji kodiraju za protein Pup_{Glu} u svom genomu sadrže i gen koji kodira za deamidazu Dop (Striebel i sur., 2009). Otkriće da protein Dop nije samo deamidaza već katalizira i reakciju depupilacije ponudilo je objašnjenje za pojavu enzima Dop u bakterija s proteinom Pup_{Glu}. Depupilaza/deamidaza Dop cijepa izopeptidnu vezu između proteina Pup i lizinskog bočnog ogranka supstrata, a mehanizam reakcije depupilacije analogan je mehanizmu reakcije deamidacije i uključuje nastanak fosfo-Pup intermedijera (Imkamp i sur., 2010; Burns i sur., 2010; Bolten i sur., 2017). Proteosomalna ATP-aza Mpa potpomaže depupilaciju tako što započinje odmatanje pupiliranog proteina čime izopeptidna veza postaje dostupnija depupilazi Dop. Važnost razmatanja pupiliranog supstrata u procesu depupilacije mogući je razlog zašto su

bakterije koje kodiraju za proteine uključene u pupilaciju, a u genomu ne sadrže proteasomalne gene ipak zadržale gene za proteasomalnu ATP-azu (Imkamp i sur., 2010; Burns i sur., 2010).

Eksperimenti *in vitro* pokazali su da se različiti pupilirani proteinski supstrati depupiliraju različitom efikasnošću. Brza depupilacija omogućila bi određenim proteinima da izbjegnu razgradnju u proteasomu, a kako je degradacija nespecifična, usmjeravanje i razgradnja proteina mogla bi biti regulirana na razini pupilacije i depupilacije. Međutim, moguće je da u staničnim uvjetima neki drugi faktori reguliraju usmjeravanje ciljnih proteina u 20S proteasom (Laederach i sur., 2019).

Kako enzim Dop katalizira dvije oprečne reakcije, bitno je da njegova depupilacijska aktivnost bude regulirana kako bi se sprječila nepotrebna konjugacija, a zatim uklanjanje proteina Pup s proteinskog supstrata. Za regulaciju je ključna Dop-petlja, konzervirani strukturni element od otprilike 40 aminokiselina koji se nalazi u blizini aktivnog mjesta. Petlja nije esencijalna za aktivnost enzima, no mutanti bez Dop-petlje skloniji su depupilaciji. Dop-petlja djeluje kao alosterički regulator i omogućuje efikasniju reakciju deamidacije, a inhibira depupilaciju mehanizmom koji još nije razjašnjen. Drugi stupanj regulacije aktivnosti proteina Dop odvija se pomoću njegove razgradnje proteazom ClpCP u uvjetima starvacije što ukazuje na povezanost dva puta uključenih u proteostazu, razgradnja proteazama i proteasomalna degradacija. Na taj način je pupilacija i proteasomalna razgradnja regulirana proteazom ClpCP koja kontrolira količinu enzima Dop. Način na koji proteaza ClpCP prepoznaje protein Dop te cijeli sustav regulacije aktivnosti proteina Dop nisu još u potpunosti razjašnjeni (Hecht i sur., 2020).

Osim depupilacije, ciljni proteini mogu proći i kroz reakcije transpupilacije. Prijenos proteina Pup s donorskog proteinskog supstrata na drugi protein katalizira ligaza PafA, a reakcija se odvija u dva stupnja. U prvom stupnju donor se depupilira pomoću anorganskog fosfata i pritom nastaje Pup-γ-glutamil fosfat. U drugom koraku nastaje izopeptidna veza između proteina Pup i recipijenta, a oslobađa se anorganski fosfat. Mehanizam reakcije sličan je transferaznoj reakciji koju katalizira glutamin-sintetaza, što nije iznenađujuće budući da enzimi pripadaju istoj skupini enzima. Naime, glutamin-sintetaza, uz reakciju nastajanja glutamina iz glutamata i amonijaka, katalizira i transferaznu reakciju u kojoj se glutamilska skupina prenosi s glutamina na hidroksilamin. Kako je transferazna aktivnost ligaze PafA za sada zabilježena samo u uvjetima *in vitro*, preostaje pitanje ima li ona ikakav značaj u fiziološkim uvjetima gdje je koncentracija ATP-

a veća od koncentracije ADP-a što favorizira reakciju pupilacije (Zhang i sur., 2017; Hecht i sur., 2018).

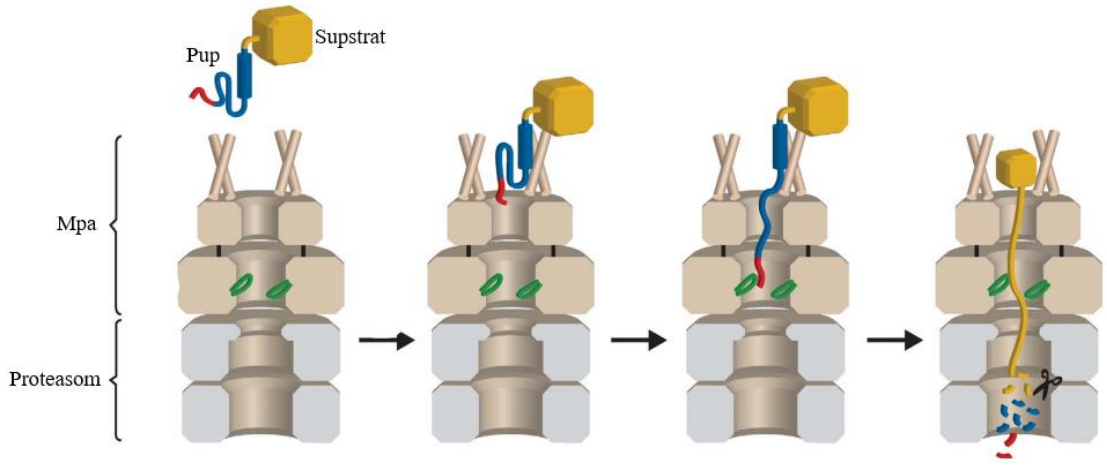
5. SUSTAV PUP-PROTEASOM

5.1. Proteasomalna razgradnja pupiliranih proteina

Kao što je već ranije spomenuto, da bi se supstrat mogao degradirati u središnjoj komori 20S proteasoma, prvo mora doći do otvaranja ulaza u proteasom u čemu sudjeluje GQYL motiv aktivatora Mpa/ARC. Taj motiv nalikuje motivu HbYX (hidrofobna aminokiselina-tirozin-bilo koja aminokiselina) koji je prisutan u arhejskih i eukariotskih aktivatora 20S proteasoma (Kusmierczyk i sur., 2011; Jastrab i sur., 2015). Uslijed vezanja ATP-a, motiv HbYX veže se u utore između susjednih α-podjedinica i uzrokuje njihovu rotaciju što za posljedicu ima otvaranje 20S proteasoma (Rabl i sur., 2008). U aktivatora Mpa/ARC motiv GQYL zaklonjen je domenom β-hvat zbog čega su interakcije između aktivatora i 20S sržne čestice proteasoma slabe (Wu i sur., 2017). Vezanje ATP-a uzrokuje promjenu konformacije proteina Mpa koji poprima oblik fleksibilnog prstena te je u takvoj konformaciji motiv GQYL izložen i može interagirati s 20S proteasomom kako bi se potaknula aktivacija proteasoma. Pretpostavlja se da je za potpunu aktivaciju 20S proteasoma i njegovo otvaranje, uz ATP-azu Mpa potrebno i djelovanje drugih, za sad nepoznatih faktora (Yin i sur., 2021).

N-terminalna superzavojnica enzima Mpa prepoznaje pupilirani proteinski supstrat vezanjem za bočne ogranke 21-58 proteina Pup. Nakon prepoznavanja dolazi do razmatanja i translokacije proteina u komore proteasoma u čemu pomaže N-terminalni dio proteina Pup. Nakon što se C-terminalni dio proteina Pup veže za superzavojnicu aktivatora Mpa, N-terminalni dio proteina se gura i provlači kroz poru koju čini aktivator te ostvaruje interakcije s petljama motiva Ar-Hb-Gly (aromatska aminokiselina – hidrofobna aminokiselina – glicin) koje dovode do razmatanja i daljnjeg provlačenja proteina Pup kroz poru, a zatim i do razmatanja proteinskog supstrata (Striebel i sur., 2010; Wang i sur., 2010).

U središnjoj komori proteasoma zatim dolazi do razgradnje proteina (slika 9.). Za razliku od proteasomalne razgradnje u eukariota gdje 19S regulatorna čestica uklanja ubikvitin sa supstrata kako se oni razgrađuju (Nelson i Cox, 2017), protein Pup se degradira u proteasomu zajedno sa supstratom i ne reciklira u *in vitro* uvjetima (Striebel i sur., 2010).



Slika 9. Shematski prikaz koraka tijekom proteasomalne razgradnje pupiliranih proteina. Aktivator Mpa veže pupilirani proteinski supstrat, a zatim ga razmata i translocira u komoru 20S proteasoma gdje se supstrat razgrađuje. Preuzeto i prilagođeno prema Striebel i sur., 2010.

5.2. Regulacija proteasomalne razgradnje

Proteasom eukariota i arheja reguliran je različitim oblicima postranslacijskih modifikacija kao što su O-glikozilacija (Zachara i Hart, 2004), N-miristoilacija (Lee i Shaw, 2007) ili N(α)-acetilacija (Kimura i sur., 2000), dok ti oblici regulacije aktivnosti proteasoma nisu zabilježeni kod bakterija. Način regulacije aktivnosti kojeg dijele proteasomi iz sve tri domene života je fosforilacija. Kinaza PknB fosforilira mikobakterijski proteasom na tri treoninske pozicije u α-podjedinici. Prvo se fosforilira Thr84 koji se nalazi u unutrašnjosti proteasoma, na dodiru α-podjedinice i β-podjedinice, zbog čega se njegova fosforilacija događa prije sastavljanja cjelovitog 20S proteasoma. Fosforiliraju se i Thr178 i Thr202 koji se nalaze na površini proteasoma. Moguće je da njihova fosforilacija uzrokuje promjene u interakcijama između α-podjedinica i aktivatora proteasoma i tako mijenja aktivnost proteasoma. Ustanovljeno je da uslijed fosforilacije α-podjedinice dolazi do pojačane razgradnje proteinskog supstrata Ino1 (Anandan i sur., 2014).

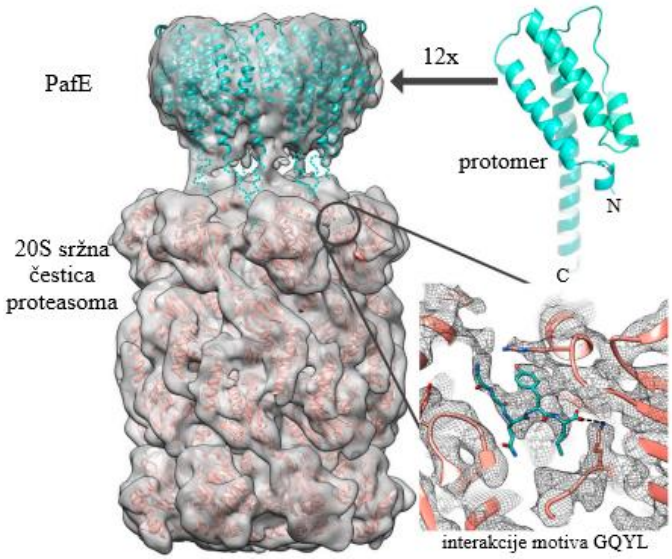
Kinaza PknA fosforilira α-podjedinice i neprocesirane β-podjedinice što onemogućuje procesiranje β-podjedinica i sklapanje cjelovitog proteasoma. Negativni utjecaj kinaze PknA na aktivnost proteasoma povezana je s otpornosti na vodikov peroksid (Anandan i sur., 2014). Mutanti koji nemaju funkcionalan sustav proteasomalne degradacije rezistentniji su na djelovanje

vodikovog peroksida od divljeg tipa (Darwin i sur., 2003). Na taj način inhibicija sastavljanja holoproteasoma fosforilacijom omogućuje preživljavanje bakteriji *M. tuberculosis* u uvjetima oksidativnog stresa. Pretpostavljeno je da se to ostvaruje povećanjem količine enzima uključenih u odgovoru na oksidativni stres. Enzimi, koji bi inače bili supstrati proteasoma, uslijed inhibicije sklapanja holoproteasoma prisutni su u stanici u većoj koncentraciji i tako doprinose povećanoj rezistenciji na oksidativni stres (Anandan i sur., 2014).

Regulacija proteasomalne razgradnje ostvaruje se i na razini modulacije aktivnosti aktivatora proteasoma. Pupilacija aktivatora Mpa uzrokuje deoligomerizaciju aktivatora te on ne može asocirati s proteasomom. Kako je reakcija pupilacije reverzibilna, protein Mpa nakon depupilacije ponovno je aktivan (Delley i sur., 2012).

5.3. Alternativni proteosomalni kompleks

Osim proteina Mpa, okarakteriziran je još jedan aktivator 20S proteasoma. Radi se o proteinu PafE (engl. *proteasome accessory factor E*) poznatom i kao Bpa (engl. *bacterial proteasome activator*) koji kao i aktivator Mpa na C-kraju nosi motiv GQYL (Delley i sur., 2014; Jastrab i sur., 2015). Protein PafE građen je od dvanaest protomera kojeg čine svežnjevi četiri zavojnice (slika 10.), a protomeri se asociraju u prsten s 40 Å širokom središnjom porom (Bai i sur., 2016; Bolten i sur., 2016). Pokazano je da su represor HspR (engl. *heat-shock protein repressor*) i protein β-kazein, supstrati kompleksa PafE-proteasoma te bi zbog toga ovakav alternativni proteosomalni kompleks mogao sudjelovati u odgovoru na povišenu temperaturu. Kako je protein β-kazein model za proučavanje nesmotanih proteina u uvjetima toplinskog stresa, sustav PafE-proteasom uklanjao bi denaturirane proteine, a razgradnjom represora HspR omogućila bi se ekspresija gena koji kodiraju za proteine uključene u odgovor na toplinski stres (Delley i sur., 2014; Jastrab i sur., 2015).



Slika 10. Struktura aktivatora PafE u kompleksu s 20S sržnom česticom proteasoma. Prikazane su interakcije koje motiv GQYL proteina PafE ostvaruje s proteasomom. Preuzeto i prilagođeno prema Bolten i sur., 2016.

Za razliku od ATP-aze Mpa, proteinu PafE za aktivaciju proteasoma nije potreban ATP (Jastrab i sur., 2015.). Protein PafE motivom GQYL ostvaruje interakcije s ograncima Arg-26 i Lys-52 α-podjedinica proteasoma što dovodi do rotacije sedam α-podjedinica i povećanja promjera ulaza u proteasom. U unutrašnjosti proteasomalnog aktivatora PafE nalaze se hidrofobne aminokiseline s kojima interagira proteinski supstrat koji je pogrešno ili djelomično smotan. Tako protein PafE ne bi samo aktivirao proteasom već imao i šaperonsku ulogu (Hu i sur., 2018.).

6. VAŽNOST PROTEASOMALNE RAZGRADNJE POSREDOVANE PROTEINOM PUP

6.1. Povezanost sustava Pup-proteasom i patogenosti bakterije *Mycobacterium tuberculosis*

Bakterija *M. tuberculosis* uzročnik je tuberkuloze, a jedan od mehanizama obrane od infekcije ovim patogenom je sinteza dušikovog monoksida u makrofazima pomoću NO sintaze (MacMicking i sur., 1997), no mehanizam nije u potpunosti učinkovit i neke bakterije prežive i nastave se dijeliti (Hernández-Pando i sur., 2000). Genetičkom analizom mutanata osjetljivih na dušikov monoksid utvrđeno je da sojevi s mutacijama u genima koji kodiraju za proteine sustava Pup-proteasom pokazuju povećanu osjetljivost (Darwin i sur., 2013.). Prvotna pretpostavka bila je da je sustav Pup-proteasom odgovoran za uklanjanje proteina oštećenih djelovanjem dušikova

monoksida i na taj način omogućava preživljavanje patogena. Međutim, pokazano je da akumulacija proteina Log (engl. *lonely guy*) u stanicama uzrokuje povećanu osjetljivost bakterije *M. tuberculosis* na djelovanje dušikova monoksida (Samanovic i sur., 2015.). Gen *log* ortolog je gena *LONELY GUY* koji u biljaka kodira za enzim koji sudjeluje u posljednjem koraku sinteze hormona citokinina (Kurakawa i sur., 2007.). Enzim Log odgovoran je za sintezu citokinina u vrste *M. tuberculosis*, a njegova količina u stanici regulirana je razgradnjom u proteasomu. U slučaju mutanata s nefunkcionalnim sustavom Pup-proteasom dolazi do nakupljanja više citokinina čijom razgradnjom nastaju aldehidi štetni za stanicu (Samanovic i sur., 2015.).

Kako je funkcionalan sustav proteasomalne razgradnje nužan za infektivnost i patogenost bakterije *M. tuberculosis*, bakterijski proteasom moguća je meta lijekova. Inhibitori mikobakterijskog proteasoma moraju biti dovoljno specifični kako ne bi djelovali na eukariotski proteasom. Prepoznata su dva spoja, GL5 i HT117, koji inhibiraju bakterijski proteasoma, a ne pokazuju nikakav štetan učinak na stanice sisavaca ni u mikromolarnim koncentracijama. Spojevi GL5 i HT1 ireverzibilni su inhibitori koji ciklokarboniliraju treonin u aktivnom mjestu te dovode do konformacijske promjene koja onemogućuje regeneraciju aktivnog mjesta zbog čega proteasom više nije aktivan (Lin i sur., 2011.).

6.2. Održavanje homeostaze metalnih iona

Kao što je već ranije spomenuto, neki predstavnici skupine Actinobacteria kodiraju za proteine uključene u pupilaciju iako im nedostaje 20S sržna čestica proteasoma. Bakterija *Corynebacterium glutamicum* ne provodi proteasomalnu degradaciju proteina, ali pupilacija igra vrlo važnu ulogu u održavanju homeostaze željeza. U normalnim uvjetima deletanti Δ*pup*, Δ*arc* i Δ*dop* ne razlikuju se od divljeg tipa, no uvjetima manjka željeza mutanti slabije rastu što ukazuje na važnost pupilacije u takvim uvjetima (Küberl i sur., 2014; Küberl i sur., 2016). Pupilacijom feritina, proteina zaduženog za pohranjivanje željeza, regulira se koncentracija željeza u stanici u uvjetima nedostatka željeza. Feritin je oligomer, a pupilacijom dolazi do disocijacije podjedinica djelovanjem ATP-aze ARC te se željezo otpušta. Do ponovne oligomerizacije dolazi nakon depupilacije posredovane depupilazom Dop (Küberl i sur., 2016).

Mnogi proteini za svoje normalno funkcioniranje trebaju bakar zbog čega je ovaj mikroelement važan za odvijanje različitih staničnih procesa. No bakar je u većim koncentracijama toksičan zbog čega je potrebno kontrolirati njegovu koncentraciju u stanici. U fagosomima

makrofaga inficiranima bakterijama roda *Mycobacterium* dolazi pak do povećanja koncentracije bakra što predstavlja jedan način obrane od patogena (Samanovic i sur., 2012). Proučavanjem razlike u transkriptomu divljeg tipa *M. tuberculosis* i mutanata *pafA* i *mpa* uočena je promjena u ekspresiji represora RicR (engl. *regulated in copper repressor*) koji u uvjetima povećane koncentracije bakra disocira sa svog veznog mjesta i omogućuje ekspresiju gena uključenih u homeostazu bakra. Regulon RicR doprinosi patogenosti *M. tuberculosis*, a sojevi s konstitutivnom represijom regulona ne izazivaju infekciju u miša. U mutanata *pafA* i *mpa* geni regulona RicR reprimirani su, ali ne dolazi do nakupljanja represora RicR. Moguće objašnjenje je da u takvim mutantima dolazi do akumulacije proteina koji vežu bakar i koji su inače supstrati za proteasomalnu razgradnju. U tim uvjetima, proteini koji vežu bakar "odvlačili" bi bakar i ne bi došlo do aktivacije regulona RicR (Festa i sur., 2011; Shi i sur., 2014).

6.3. Metabolizam dušika

Kako bi se osigurala normalna biosinteza proteina u stanju starvacije aminokiselinama, eukariotske stanice oslanjaju se na proteasomalnu razgradnju postojećih staničnih proteina (Vabulas i Hartl, 2005). Sustav Pup-proteasom mogao bi obavljati istu funkciju u vrste *M. smegmatis* i reciklirati postojeće proteine kako bi se osigurali prekursori za sintezu novih. Mutanti bez gena koji kodiraju za sustav Pup-proteasom osjetljiviji su na nedostatak aminokiselina te bi tako indukcija proteasomalne razgradnje mogla omogućiti preživljavanje u stresnim uvjetima (Elharar i sur., 2014).

Analiza proteoma soja *M. smegmatis* defektnog u pupilaciji upućuje na ulogu pupilacije u odgovoru na stres neovisnoj o proteasomalnoj razgradnji. Pokazano je da u uvjetima nedostatka izvora dušika, mutant pokazuje promjenu u razini 41 % analiziranih proteina posebica proteina kodiranih genima regulona GlnR (Fascellaro i sur., 2016). Represor GlnR kontrolira ekspresiju gena uključenih u metabolizam dušika i regulira aktivaciju tih gena u uvjetima starvacije (Jeßberger i sur., 2013). Tako bi protein Pup, osim usmjeravanjem proteina u proteasom, na metabolizam dušika utjecao i kroz regulaciju ekspresije gena uključenih u asimilaciju dušika (Fascellaro i sur., 2016).

U bakteriji *M. tuberculosis* proteasomalna razgradnja također sudjeluje u procesu asimilacije dušika. Proteasomalni supstrat je regulatorni protein HrcA koji reprimira ekspresiju gena koji kodiraju za šaperoninski sustav GroEL/GroES. Nitrit-reduktaza neaktivna je bez

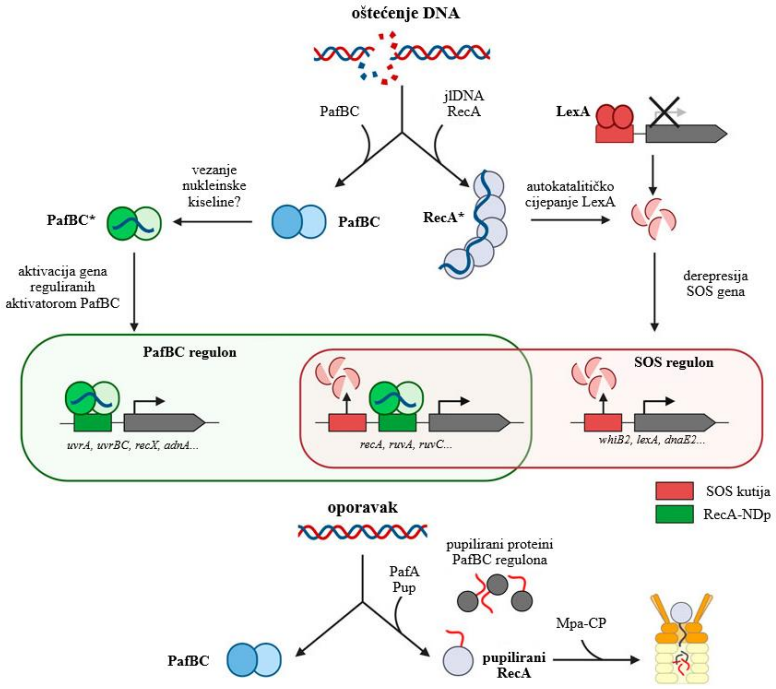
djelovanja šaperona GroEL/GroES zbog čega mutanti s nefunkcionalnim sustavom Pup-proteasom ne mogu reducirati nitrate. Naime, ako nema degradacije represora HrcA, geni *groEL/groES* se ne eksprimiraju te se zbog neaktivne nitrit-reduktaze nitrati se ne mogu koristiti kao izvor dušika jer do dolazi akumulacije nitrita u količinama toksičnima za stanicu (Becker i sur., 2019).

6.4. Oštećenja DNA

Kako bi se omogućilo normalno funkcioniranje, za svaku stanicu je krucijalno održati integritet genoma zbog čega postoje različiti putevi popravka DNA koji se aktiviraju u slučaju oštećenja. U slučaju velikih oštećenja genoma i nakupljanja jednolančane DNA aktivira se SOS-odgovor kojim se zaustavljaju stanične diobe i pokreće translezijska sinteza. U indukciji SOS gena sudjeluje protein RecA koji se veže za jednolančane regije DNA i stimulira autokatalitičko cijepanja represora LexA te tako oslobađa SOS gene od represije (Voet i Voet, 2011).

U mikobakterija postoji i odgovor na velika oštećenja DNA koji je neovisan o proteinima RecA i LexA, a reguliran je proteinima PafB (engl. *proteasome accessory factor B*) i PafC (engl. *proteasome accessory factor C*) i proteasomom (Olivencia i sur., 2017; Müller i sur., 2018). Geni *pafB* i *pafC* nalaze se u operonu *pafABC*, no nisu esencijalni za pupilaciju ili funkcioniranje proteasoma (Festa i sur., 2007.). Heterodimerni kompleks PafBC transkripcijski je aktivator u čijoj se strukturi razlikuje šest domena: dvije HTH domene s motivom zavojnica-okret-zavojnica (engl. *helix-turn-helix*), WYL domena s konzerviranim slijedom triptofanil-tirozil-leucin i dvije WCX domene koje predstavljaju produženje WYL domene na C-kraju. Motiv zavojnica-okret-zavojnica čest je kod bakterijskih regulatornih proteina koji vežu DNA, a WYL domena sadrži Sm motiv koji je često prisutan u RNA-vezujućih proteina (Müller i sur., 2019).

Regulator PafBC veže se na promotorski slijed RecA-NDp (engl. *RecA-independent promoter*) i potiče transkripciju gena uključenih u popravak DNA među kojima je i RecA te na taj način PafBC posreduje u SOS odgovoru (slika 11.). Nakon popravka oštećenja dolazi do pupilacije proteina RecA i drugih proteina uključenih u popravak DNA, a zatim i do njihove proteasomalne razgradnje (Müller i sur., 2018). Kako dolazi do aktivacije proteina PafBC koji inducira gene PafBC regulona nije razjašnjeno, ali prema strukturnoj analogiji s proteinima koji vežu RNA, aktivator PafBC mogla bi biti nukleinska kiselina (Müller i sur., 2019).



Slika 11. Odgovor na oštećenje DNA putem aktivatora PafBC. U mikobakterija, uz SOS odgovor, postoji i odgovor na oštećenje DNA ovisan o aktivatoru PafBC. Uslijed vezanja liganda, aktivira se protein PafBC koji se veže na promotor Rec-NDp i aktivira transkripciju gena uključenih u popravak DNA. U fazi oporavka dolazi do pupilacije proteina PafBC regulona i njihove razgradnje u proteasomu. Preuzeto i prilagođeno prema von Rosen i sur., 2021.

7. ZAKLJUČAK

Uz proteaze, u održanju proteostaze i eliminaciji neželjenih proteina kod skupine Actinobacteria postoji i razgradnja proteina u 20S proteasomu. Bakterijski proteasom građen je kao i arhejska i eukariotska 20S sržna čestica proteasoma, no njegovo podrijetlo nije razjašnjeno. Moguće je da su geni za 20S proteasom dobiveni lateralnim prijenosom gena iz arheja ili eukariota, dok je prema drugoj teoriji bakterijski proteasom ancestralni oblik arhejskog i eukariotskog proteasoma. Kako bi proteini bili usmjereni u proteasomalnu degradaciju, konjugiraju se s proteinom Pup koji je prema funkciji sličan ubikvitinu, no strukturno je potpuno različit. Vezanje proteina Pup na proteinski supstrat odvija se u dva koraka koja kataliziraju enzimi Dop i PafA. Kako se prepoznavaju proteinski supstrati za pupilaciju nije poznato, ali pretpostavlja se da su u prepoznavanje uključeni i neki drugi faktori. Također, u aktivaciji proteasoma sudjeluju proteini Mpa/ARC i PafE no za aktivaciju potrebni su i neki drugi, za sad nepoznati faktori.

Geni koji kodiraju za enzime uključene u pupilaciju i za protein Pup prisutni su i u genomu bakterija koje nemaju 20S proteasom što sugerira da je funkcija pupilacije šira. Sustav Pup-proteasom omogućuje nesmetano odvijanje brojnih staničnih procesa, a važnu funkciju ima u prilagođavanju bakterija na stresne uvjete. Primjerice, bakteriji *M. tuberculosis* sustav proteasomalne razgradnje omogućuje preživljavanje unutar makrofaga domaćina.

Postoje još brojne nepoznanice o sustavu Pup-proteasom zbog čega su potrebna daljna istraživanja kako bi se bolje shvatilo funkcioniranje i važnost pupilacije i proteasomalne razgradnje u bakterija. Patogen *M. tuberculosis* kao uzročnik tuberkuloze predstavlja važan objekt istaživanja, a pojava rezistentnih sojeva donosi nove izazove u dizajnu lijekova. Bolji uvid u mehanizam kojim proteasom doprinosi virulenciji bakterije *M. tuberculosis* otvara vrata razvoju novih terapeutika.

8. LITERATURA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007): Molecular biology of the cell. Garland Science, New York.

Anandan T., Han J., Baun H., Nyayapathy S., Brown J. T., Dial R. L., Moltalvo J. A., Kim M. S., Yang S. H., Ronning D. R., Husson R. N., Suh J., Kang C. M. (2014): Phosphorylation regulates mycobacterial proteasome. J Microbiol 52: 743-754.

Baek G. H., Cheng H., Choe V., Bao X., Shao J., Luo S., Rao H. (2013): Cdc48: a swiss army knife of cell biology. J Amino Acids 2013: 183421.

Bai L., Hu K., Wang T., Jastrab J. B., Darwin K. H., Li H. (2016): Structural analysis of the dodecameric proteasome activator PafE in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 113: 1983-1992.

Barandun J., Delley C. L., Ban N., Weber-Ban E. (2013): Crystal structure of the complex between prokaryotic ubiquitin-like protein and its ligase PafA. J Am Chem Soc. 135: 6794-6797.

Barthelme D., Chen J. Z., Grabenstatter J., Baker T. A., Sauer R. T. (2014): Architecture and assembly of the archaeal Cdc48*20S proteasome. Proc Natl Acad Sci U S A 111(17): E1687-1694.

Becker S. H., Jastrab J. B., Dhabaria A., Chaton C. T., Rush J. S., Korotkov K. V., Ueberheide B., Darwin K. H. (2019): The *Mycobacterium tuberculosis* Pup-proteasome system regulates nitrate metabolism through an essential protein quality control pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 116: 3202-3210.

Bolten M., Delley C. L., Leibundgut M., Boehringer D., Ban N., Weber-Ban E. (2016): Structural analysis of the bacterial proteasome activator PafE in complex with the 20S proteasome. Structure 24: 2138-2151.

Bolten M., Vahlensieck C., Lipp C., Leibundgut M., Ban N., Weber-Ban E. (2017): Depupylase Dop requires inorganic phosphate in the active site for catalysis. J Biol Chem 292:4044-4053.

Burns K. E., Cerda-Maira F. A., Wang T., Li H., Bishai W. R., Darwin K. H. (2010): "Depupylation" of prokaryotic ubiquitin-like protein from mycobacterial proteasome substrates. Mol Cell 39:821-827.

Burns K. E., Liu W. T., Boshoff H. I. M., Dorrestein P. C., Barry C. E. 3rd (2009): Proteasomal protein degradation in Mycobacteria is dependent upon a prokaryotic ubiquitin-like protein. J Biol Chem 284:3069-3075.

Burns K. E., McAllister F. E., Schwerdtfeger C., Mintseris J., Cerda-Maira F., Noens E. E., Wilmanns M., Hubbard S. R., Melandri F., Ovaa H., Gygi S. P., Darwin K. H. (2012): *Mycobacterium tuberculosis* prokaryotic ubiquitin-like protein-deconjugating enzyme is an unusual aspartate amidase. J Biol Chem 287: 37522-37529.

Chen X., Li C., Wang L., Liu Y., Li C., Zhang J. (2016): The mechanism of *Mycobacterium smegmatis* PafA self-pupylation. PLoS One 11: e0151021.

Chen X., Solomon W. C., Kang Y., Cerda-Maira F., Darwin K. H., Walters K. J. (2009): Prokaryotic ubiquitin-like protein Pup is intrinsically disordered. J Mol Biol 392: 208-217.

Darwin K. H., Ehrt S., Gutierrez-Ramos J. C., Weich N., Nathan C. F. (2003): The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. Science 302: 1963-1966.

Darwin K. H., Lin G., Chen Z., Li H., Nathan C. F. (2005): Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue. Mol Microbiol 55: 561-571.

Delley C. L., Laederach J., Ziemski M., Bolten M., Boehringer D., Weber-Ban E. (2014): Bacterial proteasome activator bpa (rv3780) is a novel ring-shaped interactor of the mycobacterial proteasome. PLoS One 9: e114348.

Delley C. L., Striebel F., Heydenreich F. M., Özcelik D., Weber-Ban E. (2012): Activity of the mycobacterial proteasomal ATPase Mpa is reversibly regulated by pupylation. J Biol Chem 287: 7907-7914.

Djuranovic S., Hartmann M. D., Habeck M., Ursinus A., Zwickl P., Martin J., Lupas A. N., Zeth K. (2009): Structure and activity of the N-terminal substrate recognition domains in proteasomal ATPases. Mol Cell 34: 580-590.

Elharar Y., Roth Z., Hermelin I., Moon A., Peretz G., Shenkerman Y., Vishkautzan M., Khalaila I., Gur E. (2014): Survival of mycobacteria depends on proteasome-mediated amino acid recycling under nutrient limitation. EMBO J. 33: 1802-1814.

Fascellaro G., Petrera A., Lai Z. W., Nanni P., Grossmann J., Burger S., Biniossek M. L., Gomez-Auli A., Schilling O., Imkamp F. (2016): Comprehensive proteomic analysis of nitrogen-starved *Mycobacterium smegmatis* Δ*pup* reveals the impact of pupylation on nitrogen stress response. J Proteome Res 15: 2812-2825.

Festa R. A., Jones M. B., Butler-Wu S., Sinsimer D., Gerads R., Bishai W. R., Peterson S. N., Darwin K. H. (2011): A novel copper-responsive regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 79: 133-148.

Festa R. A., Pearce M. J., Darwin K. H. (2007): Characterization of the proteasome accessory factor (paf) operon in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 189: 3044-3050.

Fudrini Olivencia B., Müller A. U., Roschitzki B., Burger S., Weber-Ban E., Imkamp F. (2017): *Mycobacterium smegmatis* PafBC is involved in regulation of DNA damage response. Sci Rep. 2017 7: 13987.

Goldberg A. L. (2003): Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature 426: 895-899.

Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D., Huber R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. Nature 386: 463-471.

Gur E., Biran D., Ron E. Z. (2011): Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria – how and when?. Nat Rev Microbiol 9 :839-848.

Guth E., Thommen M., Weber-Ban E. (2011): Mycobacterial ubiquitin-like protein ligase PafA follows a two-step reaction pathway with a phosphorylated Pup intermediate. J Biol Chem 286: 4412-4419.

Hecht N., Becher M., Korman M., Vishkautzan M., Gur E. (2020): Inter- and intramolecular regulation of protein depupylation in *Mycobacterium smegmatis*. FEBS J. 287: 4389-4400.

Hecht N., Regev O., Dovrat D., Aharoni A., Gur E. (2018): Proteasome accessory factor A (PafA) transferase activity makes sense in the light of its homology with glutamine synthetase. J Mol Biol 430: 668-681.

Hernández-Pando R., Jeyanathan M., Mengistu G., Aguilar D., Orozco H., Harboe M., Rook G. A., Bjune G. (2000): Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. Lancet 356: 2133-2138.

Hirano Y., Hayashi H., Iemura S., Hendil K. B., Niwa S., Kishimoto T., Kasahara M., Natsume T., Tanaka K., Murata S. (2006): Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. Mol Cell 24: 977-984.

Hu G., Lin G., Wang M., Dick L., Xu R. M., Nathan C., Li H. (2006): Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome and mechanism of inhibition by a peptidyl boronate. Mol Microbiol 59: 1417-1428.

Hu K., Jastrab J. B., Zhang S., Kovach A., Zhao G., Darwin K. H., Li H. (2018): Proteasome substrate capture and gate opening by the accessory factor PafE from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 293: 4713-4723.

Huber E. M., Heinemeyer W., Li X., Arendt C. S., Hochstrasser M., Groll M. (2016): A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome. Nat Commun 7:10900.

Imkamp F., Striebel F., Sutter M., Ozcelik D., Zimmermann N., Sander P., Weber-Ban E. (2010): Dop functions as a depupylase in the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway. EMBO Rep. 11: 791-797.

Jastrab J. B., Wang T., Murphy J. P., Bai L., Hu K., Merkx R., Huang J., Chatterjee C., Ovaa H., Gygi S. P., Li H., Darwin K. H. (2015): An adenosine triphosphate-independent proteasome activator contributes to the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 112: 1763-1772.

Jeßberger N., Lu Y., Amon J., Titgemeyer F., Sonnewald S., Reid S., Burkovski A. (2013): Nitrogen starvation-induced transcriptome alterations and influence of transcription regulator mutants in *Mycobacterium smegmatis*. BMC Res Notes 6: 482.

Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S., Sassa H., Tanaka K., Polevoda B., Sherman F., Hirano H. (2000): N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. J Biol Chem 275: 4635-4639.

Knipfer N., Shrader T. E. (1997): Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol 25: 375-383.

Küberl A., Fränzel B., Eggeling L., Polen T., Wolters D. A., Bott M. (2014): Pupylated proteins in *Corynebacterium glutamicum* revealed by MudPIT analysis. Proteomics 14: 1531-1542.

Küberl A., Polen T., Bott M. (2016): The pupylation machinery is involved in iron homeostasis by targeting the iron storage protein ferritin. Proc Natl Acad Sci U S A 113: 4806-4811.

Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyozuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. Nature 445: 652-655.

Kusmierczyk A. R., Kunjappu M. J., Kim R. Y., Hochstrasser M. (2011): A conserved 20S proteasome assembly factor requires a C-terminal HbYX motif for proteasomal precursor binding. Nat Struct Mol Biol 18: 622-629.

Kwon Y. D., Nagy I., Adams P. D., Baumeister W., Jap B. K. (2004): Crystal structures of the *Rhodococcus* proteasome with and without its pro-peptides: implications for the role of the pro-peptide in proteasome assembly. J Mol Biol 335: 233-245.

Laederach J., Cui H., Weber-Ban E. (2019): Pupylated proteins are subject to broad proteasomal degradation specificity and differential depupylation. PLoS One 14: e0215439.

Lee S. C., Shaw B. D. (2007): A novel interaction between N-myristoylation and the 26S proteasome during cell morphogenesis. Mol Microbiol 63: 1039-1053.

Li D., Li H., Wang T., Pan H., Lin G., Li H. (2010): Structural basis for the assembly and gate closure mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* 20S proteasome. EMBO J 29: 2037-2047.

Liao S., Shang Q., Zhang X., Zhang J., Xu C., Tu X. (2009): Pup, a prokaryotic ubiquitin-like protein, is an intrinsically disordered protein. Biochem J 422: 207-215.

Lin G., Hu G., Tsu C., Kunes Y. Z., Li H., Dick L., Parsons T., Li P., Chen Z., Zwickl P., Weich N., Nathan C. (2006): *Mycobacterium tuberculosis* prcBA genes encode a gated proteasome with broad oligopeptide specificity. Mol Microbiol 59: 1405-1416.

Lin G., Li D., de Carvalho L. P., Deng H., Tao H., Vogt G., Wu K., Schneider J., Chidawanyika T., Warren J. D., Li H., Nathan C. (2009): Inhibitors selective for mycobacterial versus human proteasomes. Nature. 2009 Oct 1;461(7264):621-6.

Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 A resolution. Science 268: 533-539.

Lupas A., Zwickl P., Baumeister W. (1994): Proteasome sequences in eubacteria. Trends Biochem 19: 533-534.

MacMicking J. D., North R. J., LaCourse R., Mudgett J. S., Shah S. K., Nathan C. F. (1997): Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 5243-5248.

Mahmoud S. A., Chien P. (2018): Regulated proteolysis in bacteria. Annu Rev Biochem 87: 677-696.

Müller A. U., Imkamp F., Weber-Ban E. (2018) The Mycobacterial LexA/RecA-Independent DNA Damage Response Is Controlled by PafBC and the Pup-Proteasome System. Cell Rep 23: 3551-3564.

Müller A. U., Leibundgut M., Ban N., Weber-Ban E. (2019): Structure and functional implications of WYL domain-containing bacterial DNA damage response regulator PafBC. Nat Commun 10: 4653.

Nelson D. L., Cox M. M. (2017): Lehninger principles of biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York.

Neuwald A. F., Aravind L., Spouge J. L., Koonin E. V. (1999): AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. Genome Res9 :27-43.

Özcelik D., Barandun J., Schmitz N., Sutter M., Guth E., Damberger F. F., Allain F. H., Ban N., Weber-Ban E. (2012): Structures of Pup ligase PafA and depupylase Dop from the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway. Nat Commun. 3:1014.

Pearce M. J., Mintseris J., Ferreyra J., Gygi S. P., Darwin K. H. (2008): Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 322: 1104-1107.

Pearce M. J., Mintseris J., Ferreyra J., Gygi S. P., Darwin K. H. (2008) Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. Science 322: 1104-1107.

Pouch M. N., Cournoyer B., Baumeister W. (2000): Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia*. Mol Microbiol 35: 368-377.

Rabl J., Smith D. M., Yu Y., Chang S. C., Goldberg A. L., Cheng Y. (2008): Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. Mol Cell 30: 360-368.

Samanovic M. I., Ding C., Thiele D. J., Darwin K. H. (2012): Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. Cell Host Microbe 11: 106-115.

Samanovic M. I., Tu S., Novák O., Iyer L. M., McAllister F. E., Aravind L., Gygi S. P., Hubbard S. R., Strnad M., Darwin K. H. (2015); Proteasomal control of cytokinin synthesis protects *Mycobacterium tuberculosis* against nitric oxide. Mol Cell 57 :984-994.

Shi X., Festa R. A., Ioerger T. R., Butler-Wu S., Sacchettini J. C., Darwin K. H., Samanovic M. I. (2014): The copper-responsive RicR regulon contributes to *Mycobacterium tuberculosis* virulence. mBio 5: e00876-13.

Striebel F., Hunkeler M., Summer H., Weber-Ban E. (2010): The mycobacterial Mpa-proteasome unfolds and degrades pupylated substrates by engaging Pup's N-terminus. EMBO J 29: 1262-1271.

Striebel F., Imkamp F., Sutter M., Steiner M., Mamedov A., Weber-Ban E. (2009). Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes. Nature Structural & Molecular Biology:16: 647–651.

Tamura T., Nagy I., Lupas A., Lottspeich F., Cejka Z., Schoofs G., Tanaka K., De Mot R., Baumeister W. (1995): The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of Rhodococcus. Curr Biol 5: 766-774.

Vabulas R. M., Hartl F. U. (2005): Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. Science 310: 1960-1963.

Valas R. E., Bourne P. E. (2008): Rethinking proteasome evolution: two novel bacterial proteasomes. J Mol Evol 66: 494-504.

Voet D., Voet J.G. (2011): Biochemistry. John Wiley & Sons Inc., New York.

Volker C., Lupas A. N. (2002): Molecular evolution of proteasomes. Curr Top Microbiol Immunol 268: 1-22.

von Rosen T., Keller L. M., Weber-Ban E. (2021): Survival in hostile conditions: pupylation and the proteasome in actinobacterial stress response pathways. Front Mol Biosci 8: 685757.

Wang T., Darwin K. H., Li H. (2010): Binding-induced folding of prokaryotic ubiquitin-like protein on the *Mycobacterium* proteasomal ATPase targets substrates for degradation. Nat Struct Mol Biol 17:1352-1357.

Wang T., Li H., Lin G., Tang C., Li D., Nathan C., Darwin K. H., Li H. (2009): Structural insights on the *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase Mpa. Structure 17: 1377-1385.

Wolf S., Nagy I., Lupas A., Pfeifer G., Cejka Z., Müller S. A., Engel A., De Mot R., Baumeister W. (1998): Characterization of ARC, a divergent member of the AAA ATPase family from *Rhodococcus erythropolis*. J Mol Biol 277: 13-25.

Wu Y., Hu K., Li D., Bai L., Yang S., Jastrab J. B., Xiao S., Hu Y., Zhang S., Darwin K. H., Wang T., Li H. (2017): *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase Mpa has a β-grasp domain that hinders docking with the proteasome core protease. Mol Microbiol 105: 227-241.

Yin Y., Kovach A., Hsu H. C., Darwin K. H., Li H. (2021): The mycobacterial proteasomal ATPase Mpa forms a gapped ring to engage the 20S proteasome. J Biol Chem 296: 100713.

Zachara N. E., Hart G. W. (2004): O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. Trends Cell Biol 14: 218-221.

Zhang S., Burns-Huang K. E., Janssen G. V., Li H., Ovaa H., Hedstrom L., Darwin K. H. (2017): *Mycobacterium tuberculosis* proteasome accessory factor a (PafA) can transfer prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) between substrates. mBio 8: e00122-17.

Ziemski M., Jomaa A., Mayer D., Rutz S., Giese C., Veprintsev D., Weber-Ban E. (2018): Cdc48-like protein of actinobacteria (Cpa) is a novel proteasome interactor in mycobacteria and related organisms. Elife 7: e34055.

Zühl F., Seemüller E., Golbik R., Baumeister W. (1997): Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome. FEBS Lett 418: 189-194.

9. SAŽETAK

Pupilacija je posttranslacijska modifikacija proteina prisutna u bakterija iz koljena Actinobacteria. Mali protein Pup se izopeptidnom vezom veže na ciljni protein i predstavlja oznaku za usmjeravanje proteina u proteasomalnu razgradnju. Iako pupilacija predstavlja funkcionalnu analogiju ubikvitinaciji kod eukariota, procesi se razlikuju u enzimima koji ih provode. Reakciju pupilacije kataliziraju enzimi iz skupine karboksilat-amin ligaza, Dop i PafA, a isti enzimi sudjeluju i u reakcijama depupilacije i transpupilacije. Sustav Pup-proteasom omogućuje aktinobakterijama degradaciju nefunkcionalnih ili neželjenih proteina, a za njegovu aktivaciju potrebni su aktivatori koji omogućuju ulazak supstrata u 20S sržnu česticu proteasoma, njegovo razmatanje i translokaciju. Proteini Mpa/ARC za aktivaciju 20S proteasoma koriste ATP, dok protein PafE predstavlja aktivator neovisan o ATP-u.

Proteasomalna razgradnja proteina uključena je u obavljanje i regulaciju brojnih staničnih procesa kao što su popravak DNA, regulacija količine metalnih iona u stanici te normalno funkcioniranje metabolizma dušika. Za patogenost bakterije *M. tuberculosis* koja uzrokuje tuberkulozu nužan je sustav Pup-proteasom zbog čega proces pupilacije i 20S proteasom predstavljaju moguće mete u borbi protiv ove bakterije.

10. SUMMARY

Pupylation is a post-translational modification of proteins present in the bacterial phylum Actinobacteria. The small protein Pup is bound to the target protein by a isopeptide bond and represents a mark that directs proteins to proteasomal degradation. Although pupylation is functionally analogous to ubiquitination in eukaryotes, the processes differ in the enzymes that carry them out. The reaction of pupylation is catalyzed by enzymes from the family of carboxylate amine ligases, Dop and PafA, that are also involved in depupylation and transpupylation reactions. The Pup-proteasome system in actinobacteria allows degradation of nonfunctional or damaged proteins and the activators are required to enable the entry, unfolding and translocation of substrates in the 20S core particle of the proteasome. Proteins Mpa/ARC use ATP for the proteasome activation whereas protein PafE is an activator independent of ATP.

Proteasomal degradation of proteins is involved in functioning and regulation of numeorous cell processes like DNA repair, regulation of metal ions concentration in the cell and normal nitrogen metabolism. The Pup-proteasome system is necessary for pathogenicity of *M. tuberculosis* that causes tuberculosis, which suggests that the process of pupylation and 20S proteasome could be targets in the battle against this bacterium.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Julia Jelena Toplak

Datum rođenja: 9. listopada 1999.

Mjesto rođenja: Stuttgart, Savezna Republika Njemačka

Obrazovanje

2006.-2014. Osnovna škola Prelog, Prelog

2014.-2018. Srednja škola Prelog, Prelog

2018.-2021. Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. Dan i noć na PMF-u