

# Fosforilacija arginina: poljubac smrti za bakterijske proteine

---

**Pajski, Matea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:217:961152>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-05**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Matea Pajski

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Fosforilacija arginina: poljubac smrti za bakterijske proteine**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

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

Zagreb, 2020. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

11. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

25. rujna 2020.

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

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Posttranslacijske modifikacije proteina.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1. Fosforilacija.....</i>	<i>3</i>
<b>1.2. Razgradnja proteina.....</b>	<b>5</b>
<i>1.2.1. Lizosom.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Ubikvitinacija i 26S proteasom.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3. Pupilacija kod bakterija.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.4. ATP-ovisne proteaze kod bakterija.....</i>	<i>9</i>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Fosforilacija arginina.....</b>	<b>12</b>
<i>2.1.1. Arginin kinaza McsB.....</i>	<i>12</i>
<i>2.1.2. Fosfataza YwlE.....</i>	<i>15</i>
<b>2.2. Fosforilacija arginina i proteoliza.....</b>	<b>17</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXI</b>



## § Sažetak

Posttranslacijske modifikacije proteina i proteini koji specifično mogu prepoznati te modifikacije imaju ključnu ulogu u stvaranju dinamičnih sustava koji prepoznaju i odgovaraju na promjene u staničnoj okolini. Ove kovalentne modifikacije kontroliraju velik broj bioloških procesa, ali njihova funkcija nije ograničena samo na regulaciju enzima i razgradnju proteina, već je uključena u gotovo svaki mehanizam od diobe stanice sve do apoptoze. Najraširenija i najbolje proučena posttranslacijska modifikacija je fosforilacija. Većina istraživanja bavi se fosforilacijom serina, tirozina i treonina, ali u posljednjih desetak godina proširilo se znanje i o fosforilaciji arginina, histidina i lizina, a kinaze i fosfataze, tj. enzimi koji kataliziraju fosforilacije i defosforilacije proteina danas su glavna meta u liječenju velikog broja bolesti.

Dok u eukariotskim stanicama ubikvitin obilježava proteine za razgradnju u proteasomskom kompleksu, kod gram-pozitivnih bakterija postoji sličan, ali jednostavniji sustav obilježavanja. Taj sustav sastoji se od kinaza koje kataliziraju fosforilaciju bočnog ogranka arginina u proteinu čime se taj protein obilježi za razgradnju u proteaznom kompleksu. Također, fosforilacija arginina kod bakterija ima centralnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, očuvanju i popravaku proteina koji su podložni promjenama zbog staničnog stresa te signalizaciji i regulaciji niza staničnih procesa.



## § 1. UVOD

### 1.1. Posttranslacijske modifikacije proteina

Posttranslacijske modifikacije su reverzibilne ili ireverzibilne kovalentne modifikacije proteina do kojih dolazi u posljednjim koracima njihove biosinteze, odnosno nakon translacije RNA lanca u proteine.<sup>1</sup> Iako DNA uglavnom kodira samo 20 primarnih aminokiselina, proteini sadrže više od 100 različitih aminokiselinskih ogranaka zahvaljujući posttranslacijskim modifikacijama koje mijenjaju svojstva aminokiselina uvođenjem pozitivnog ili negativnog naboja, velikih funkcionalnih skupina, lipida, ugljikohidrata ili čak cijelih proteina. Do kovalentnih modifikacija proteina može doći prije smatanja proteina te tako modifikacija može utjecati na samo smatanje i konformacijsku stabilnost proteina, a također može usmjeriti protein u odgovarajući dio stanice. Ako do posttranslacijskih modifikacija dođe nakon smatanja proteina, može se direktno promijeniti aktivnost modificiranog proteina ili se može stvoriti novo vezno mjesto za određene domene koje prepoznaju fosfate i tako stvoriti nove protein-protein interakcije. Razumijevanje utjecaja posttranslacijskih modifikacija na funkciju i strukturu proteina bitno je za razumijevanje staničnih mehanizama.<sup>2</sup>

Razvojem tehnologije omogućena je identifikacija velikog broja novih proteinskih modifikacija, a najznačajniju ulogu u tome imala je spektrometrija mase.<sup>3</sup> Danas je poznato oko 500 vrsta posttranslacijskih modifikacija<sup>2</sup> koje su podijeljene u dvije kategorije. Prva predstavlja enzimski katalizirane adicije funkcionalnih skupina ili čak cijelih proteina na bočne ogranke aminokiselina ili na C- i N- kraj proteina. Najčešća takva modifikacija je fosforilacija, a uz nju postoje acilacija, alkilacija, ubikvitinacija itd. Popis nekih modifikacija iz ove kategorije nalazi se u tablici 1. U drugu kategoriju posttranslacijskih modifikacija spada hidroliza peptidnih veza u proteinu autokatalitičkim cijepanjem ili češće pomoću proteaza.<sup>1</sup> Spajanje dva bočna ogranka cisteina u disulfidne mostove se također ubraja u kovalentne modifikacije.<sup>4</sup>

Biološka funkcija posttranslacijskih modifikacija danas je mnogo jasnija i ne uključuje samo regulaciju enzimske aktivnosti pomoću protein kinaze A i razgradnju proteina, već je jasno da ima utjecaj na gotovo sve stanične procese.<sup>5</sup> Modifikacije poput glikozilacije,

Tablica 1. Popis najčešćih posttranslacijskih modifikacija na specifičnim aminokiselinskim ograncima i primjeri proteina koji sadrže navedenu kovalentnu modifikaciju (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (1))

<b>Aminokiselina</b>	<b>PTM</b>	<b>Primjer modificiranog proteina</b>
Asp	fosforilacija	aldolaza C
Glu	metilacija	kemoreceptori
	karboksilacija	proteini zgrušavanja krvi (faktori II, VII, IX, X, proteini C i S)
	poliglikanacija	tubulin
	poliglutamacija	tubulin
Ser	fosforilacija	glikogen-sintaza
	O-glikozilacija	mucini
Thr	fosforilacija	inhibitor I protein-fosfataze I
	O-glikozilacija	mucini
Tyr	fosforilacija	receptor za inzulin
	sulfonacija	fibrinopeptid B
	orto-nitracija	citokorm C
His	fosforilacija	histidin-kinaze (autofosforilacija)
	N-metilacija	aktin
Lys	N-metilacija	kalmodulin
	N-acilacija	histon H4
	C-hidroksilacija	kolagen
Cys	oksidacija u cistin	ribonukleaza A
	fosforilacija	PTP fosfataza
	S-acilacija	protein Ras
Met	oksidacija u sulfoksid	glutamin-sintetaza
Arg	N-metilacija	histoni H3 iH4
	N-ADP-ribozilacija	aktin
	fosforilacija	protein CtsR
Asn	N-glikozilacija	imunoglobulini (IgE, IgH, IgD, IgA)
	N-ADP-ribozilacija	eEF-2
Gln	transglutaminacija	koagulacijski faktor XIII
Trp	C-manozilacija	ribonukleaza 2
Pro	C-hidroksilacija	kolagen
Gly	C-hidroksilacija	amilin

lipidacije i formiranja disulfidnih mostova su bitne za stabilnost i pravilno smatanje novosintetiziranih proteina, a povratne modifikacije poput fosforilacije i acetilacije imaju bitnu ulogu u unutarstaničnoj signalizaciji.<sup>5,1</sup> Histoni se također acetiliraju i deacetiliraju te se na taj način regulira transkripcija DNA u RNA. Enzimi aciltransferaza i deacetilaza reguliraju ovaj proces, a oni sami su regulirani fosforilacijom.<sup>6</sup> Kod bakterijskih stanica, odgovor na temperaturni ili oksidativni stres je fosforilacija argininskih ogranaka određenih proteina koji potom reguliraju transkripciju DNA, razgradnju proteina i aktivnost chaperona.<sup>7</sup> Iz ovih nekoliko primjera vidi se da su kompleksni odgovori stanice na unutarstanične ili vanjske promjene vrlo strogo regulirani putem posttranslacijskih modifikacija.

### 1.1.1. Fosforilacija

Fosforilacija je najčešća vrsta posttranslacijske modifikacije te je određeno da čak 30% eukariotskih proteina posjeduje kovalentno vezanu fosforilnu skupinu.<sup>8</sup> Ovom reakcijom se pomoću kinaze  $\gamma$ -fosforilna skupina iz nukleozid trifosfata, najčešće adenzin trifosfata (ATP), prenosi na bočnu skupinu specifičnih aminokiselina na ciljanom proteinu.<sup>2</sup> Kod fosforiliranih proteina može se reakcijom defosforilacije, koju katalizira fosfataza, ukloniti fosforilna skupina s bočnog ogranka aminokiseline.

Poznate su četiri vrste fosfoamino veza:

1. O-fosfati kod kojih se fosforilna skupina veže na hidroksilnu skupinu tirozina, treonina i serina
2. N-fosfati kod kojih se fosforiliraju amino skupine arginina, lizina i histidina
3. acilfosfati gdje se fosforiliraju aspartat i glutamat
4. S-fosfati kod kojih je fosforilna skupina vezana na tiolnu skupinu cisteina.<sup>9,10</sup>

Najviše istražena vrsta su O-fosfati zbog toga što je njihova fosfoesterska veza stabilna u kiselim uvjetima koji se najčešće koriste tijekom pripreme i analize proteina. S druge strane N-P veza u N-fosfatima stabilna je pri bazičnim uvjetima, a u kiselima je podložna hidrolizi što otežava njihovu identifikaciju. Acilfosfati su vrlo reaktivni spojevi nestabilni u kiselom i lužnatom pa se identificirati mogu samo indirektnim metodama.<sup>7,10</sup>

Prvi fosforilirani protein bio je Vitellin koji je otkriven 1906. godine, a sadrži fosforilnu skupinu vezanu za hidroksilnu skupinu serina.<sup>11</sup> Unatoč tom otkriću, enzimski katalizirana fosforilacija prvi put je opisana tek 1954. godine na primjeru fosforilacije serina iz proteina kasein, ali svrha fosforilacije proteina nije još bila poznata. Ponuđeno je objašnjenje koje

opisuje metabolički aktivne fosfoproteine kao enzime koji služe kao fosfotransferaze u cikličkoj fosforilaciji i defosforilaciji bočnih ogranaka serina koji se nalaze u fosfoproteinu.<sup>12</sup> Razumijevanje mehanizma fosforilacije otvorilo je put razumijevanju mehanizama i funkcije ostalih posttranslacijskih modifikacija.

Prvi otkriveni primjer proteinske regulacije pomoću fosforilacije bila je glikogen-fosforilaza koja kao odgovor na hormone poput epinefrina ili glukagona katalizira razgradnju glikogena fosforolitičkim cijepanjem ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) glikozidne veze.<sup>2</sup> Glikogen-fosforilaza je homodimer te svaka podjedinica proteina sadrži po jedan serin koji se može fosforilirati. Fosforilacijom serina glikogen-fosforilaza mijenja konformaciju zbog čega razlikujemo dvije forme proteina - aktivna fosforilaza a i inaktivna fosforilaza b. Na N-kraju proteina nalaze se 4 bazične aminokiseline (slijed od 9. do 16. aminokiseline je KRKQISVR). Kod inaktivne glikogen-fosforilaze b, 20 aminokiselina s N-kraj smješteno je blizu područja koje sadrži velik broj kiselih aminokiselina, aspartata i glutamata, s kojima stvara elektrostatske interakcije. Fosforilacijom bočnog ogranka Ser14 kidaju se te elektrostatske interakcije i N-kraj proteina mijenja položaj kako bi se omogućio nastanak interakcija fosforiliranog serina i bočnog ogranka Arg69 iz iste podjedinice i Arg43\* iz druge podjedinice, a izoleucin i valin koji okružuju fosforilirani serin smještaju se u nepolarne džepove na površini proteina. Ovaj pomak aminokiselina s N-kraja uzrokuje i pomak petlje koju čini slijed od 282. do 286. aminokiseline čime se aktivno mjesto otvara prema površini proteina te na taj način fosforilaza postaje aktivna.<sup>2,13</sup> I aktivnost same kinaze glikogen-fosforilaze regulira se fosforilacijom pomoću cAMP (ciklički adenzin-monofosfat) ovisne protein kinaze A. Stanični odgovor na epinefrin u mišićima ili glukagon u jetri je povišenje koncentracije cAMP-a koji služi kao sekundarni glasnik te alosterički aktivira protein kinazu A koja zatim fosforilira i tako aktivira kinazu glikogen-fosforilaze. Time je fosforilacija serina/treonina određena kao ključni mehanizam za regulaciju enzimske aktivnosti.<sup>2,13,14</sup>

Tirozinske protein-kinaze spadaju u posebnu skupinu kinaza. One služe kao receptori za inzulin i za faktore rasta te imaju mogućnost autofosforilacije. Neki proteini imaju formirane domene Src homolog 2 (SH2) koje prepoznaju i specifično vežu fosforilirani tirozin.<sup>2,14</sup> Budući da tirozinske protein-kinaze imaju bitnu funkciju u prijenosu signala, regulaciji enzimske aktivnosti i u regulaciji staničnog ciklusa, mutirani oblici navedenih protein-kinaza mogu rezultirati razvojem tumorskih stanica.<sup>13,14</sup> Zbog toga su razvijeni inhibitori koji vezanjem na katalitičku domenu inaktiviraju kinaznu aktivnost te služe kao lijek za rak.<sup>14</sup>

## 1.2. Razgradnja proteina

Razgradnja proteina je selektivan i iznimno strogo reguliran proces. Vrijeme poluživota razlikuje se za svaki protein i može trajati od nekoliko minuta do nekoliko desetaka dana.<sup>15</sup> Primarna funkcija razgradnje je uklanjanje nepravilno smotanih ili oštećenih proteina, no osim toga razgradnja ima bitnu funkciju u regulaciji diobe stanica i ekspresije gena.<sup>16</sup> Također, kratak poluživot proteina povećava sposobnost organizma na adaptaciju na vanjske promjene te što se brže enzimi razgrađuju, brže mogu mijenjati svoje unutarstanične koncentracije kao odgovor na hormonalne promjene.<sup>17</sup>

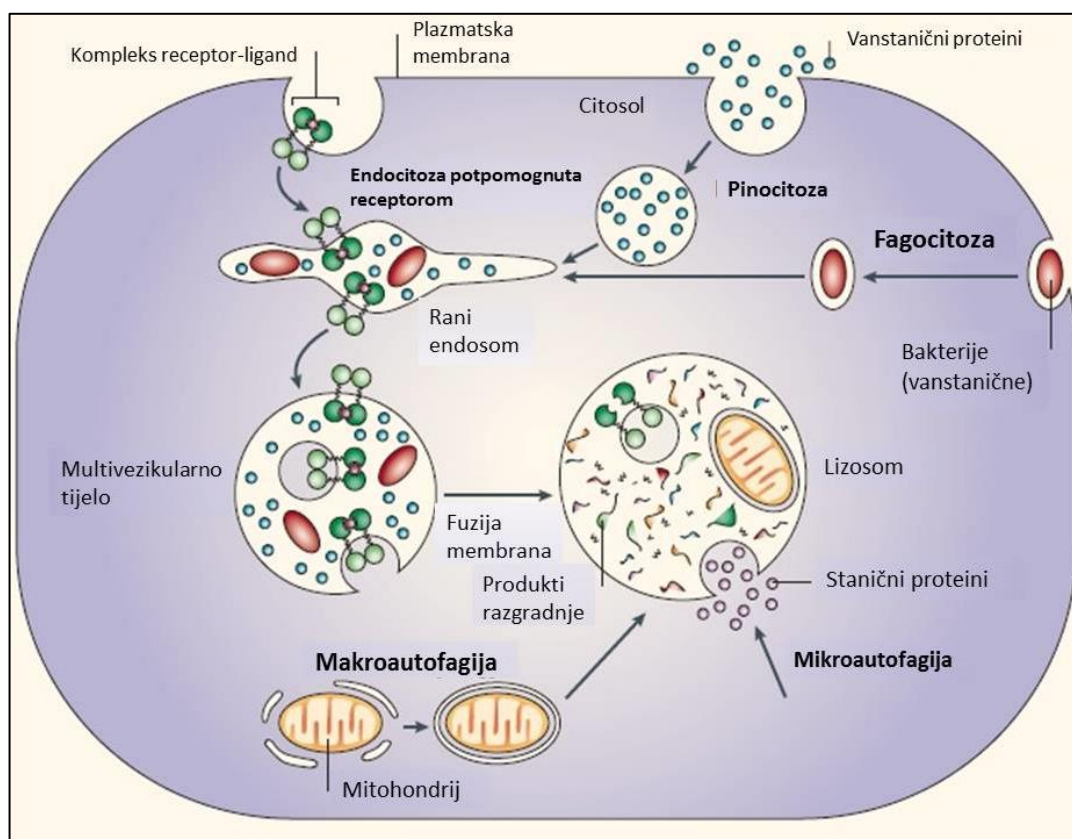
Različiti broj nepravilnosti kod proteina uzrokuje njihovu razgradnju. Nepravilnost može biti posljedica pogreške u transkripciji ili translaciji, ali ipak stanica ne razgrađuje sve mutirane proteine već samo one kod kojih mutacija značajno sprječava pravilno smatanje proteina.<sup>15,17</sup> Unatoč tome 30% pravilno sintetiziranih proteina razgradi se zbog neuspješnog smatanja, a najkritičniji korak tijekom smatanja je vezanje kofaktora i asocijacija podjedinica kod multimeričkih proteina.<sup>15</sup> Nepravilno smotani proteini imaju na površini izložene hidrofobne skupine te mogu ometati smatanje drugih proteina u stanici asocijacijom s njihovim hidrofobnim dijelovima koji su tijekom procesa smatanja izloženi. Unutar stanice postoji mogućnost oštećenja proteina i nakon sinteze jer su izloženi blagim denaturacijskim uvjetima i visoko reaktivnim vrstama, a vjerojatnost za oštećenjem povećava se tijekom temperaturnog ili oksidativnog stresa.<sup>2,15</sup>

Budući da nepravilno smotani proteini imaju izložene svoje hidrofobne dijelove oni međusobno asociraju i tvore jednu od tri vrste agregata – amorfni agregati, oligomeri i amiloidna vlakna.<sup>6</sup> Stvaranje i nakupljanje agregata u tkivima povezano je s bolestima nazvanim amiloidozom u koje ubrajamo Alzheimerovu bolest, prionske bolesti, Parkinsonovu bolest i druge. Stanica agregate sprječava ponovnim smatanjem proteina i stabilizacijom intermedijera tijekom smatanja uz pomoć chaperona koji se vežu za „ljepljive“ hidrofobne krajeve.<sup>2</sup>

Oštećeni proteini i oni s vrlo kratkim vremenom poluživota razgrađuju se u ATP-ovisnim citosolnim sustavima i kod eukariota i kod bakterija. Kralježnjaci membranske proteine, vanstanične proteine i one s dugim vremenom poluživota razgrađuju u specifičnim organelima lizosomima.<sup>2</sup>

### 1.2.1. Lizosom

Lizosomi su organeli obavijeni jednostrukom membranom unutar koje se nalaze enzimi za razgradnju pri vrlo niskom pH.<sup>2</sup> U lumenu lizosoma razgrađivati se mogu RNA i DNA pomoću nukleaza na mononukleotide, proteaze razgrađuju proteine, fosfataze uklanjaju fosfatnu skupinu s proteina i ostalih spojeva, lipaze cijepaju lipide i postoji još velik broj enzima koji razgrađuju ostale kompleksne spojeve.<sup>4</sup> Ti enzimi najbolje rade pri kiselim uvjetima koji su prisutni unutar lizosoma što predstavlja i osiguranje stanice ako dođe do puknuća lizosoma. Kada bi došlo do izlivanja unutrašnjosti lizosoma u citoplazmu gdje je pH oko 7, enzimska aktivnost bi se smanjila i ne bi oštetila unutrašnjost stanice.<sup>18</sup> Dvije vrste membranskih transportera pumpaju vodikove i kloridne ionu iz citosola u unutrašnjost lizosoma i na taj način održavaju nizak pH.<sup>16</sup> Razlikujemo nekoliko vrsta lizosomskih stanica. Primarni lizosomi imaju sferni oblik te spajanjem s drugim organelima i vezikulama pretvaraju se u sekundarne lizosome koji su veći od primarnih i nepravilnog su oblika.<sup>4</sup>



Slika 1. Putevi ulaska tvari u lizosom (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (16))

Heterofagija je zajednički naziv za tri načina ulaska vanstaničnih tvari u stanicu – endocitozu pomoću receptora, pinocitozu i fagocitozu. Endocitozom pomoću receptora i pinocitozom u stanicu ulaze vanstanični proteini i tvore vezikulu sa ili bez receptora, a veće čestice poput bakterija ili manjih stanica ulaze fagocitozom i unutar stanice tvore fagosom.<sup>4</sup> Fagosomi i vezikule spajaju se u rani endosom i dalje razvijaju u multivezikularno tijelo koje se ujedinjuje s primarnim lizosomom što rezultira razgradnjom vanstaničnih tvari.<sup>4,16</sup>

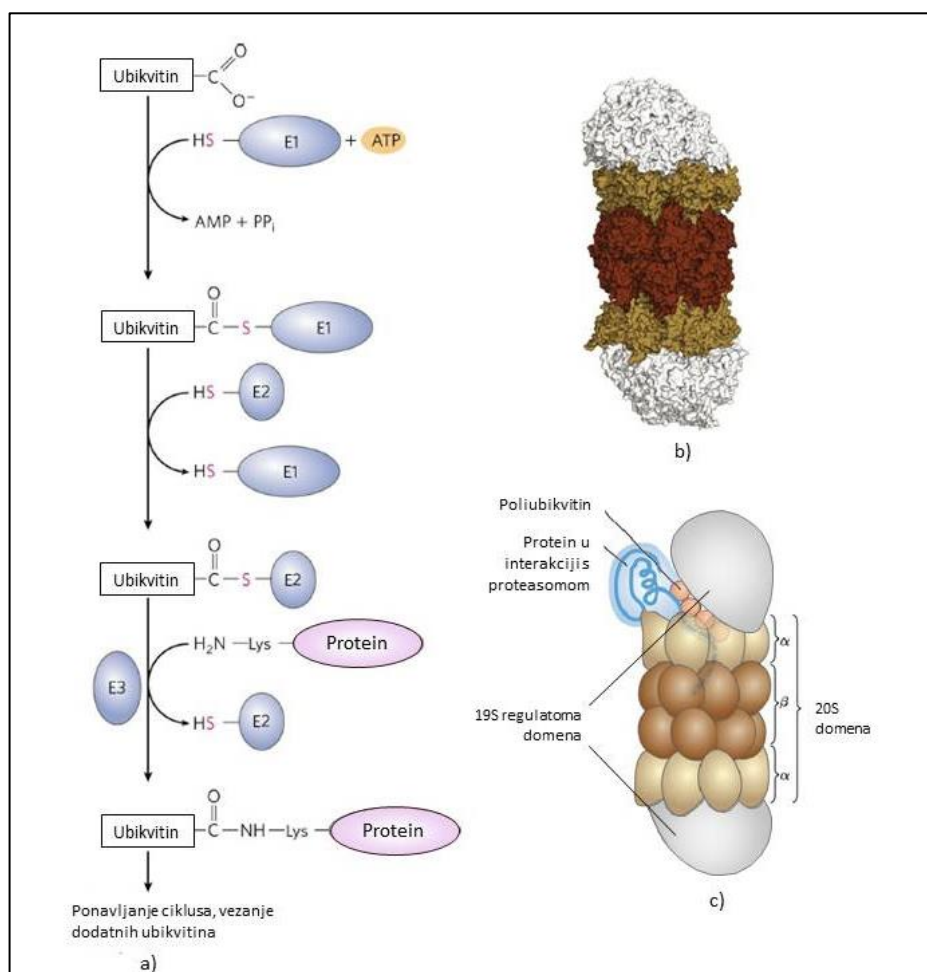
Unutarstanični proteini ulaze u lizosom procesom mikroautofagije, a organeli procesom makroautofagije što se najčešće događa kad je stanica pod stresom i čime nastaje autofagosom, dvomembranska vezikula koja zatim ulazi u lizosom gdje se sadržaj razgrađuje.<sup>16</sup> Shematski prikaz ulazaka proteina, organela i bakterija u lizosom prikazan je na slici 1.

### 1.2.2. Ubikvitinacija i 26S proteasom

Glavni oblik ATP-ovisne razgradnje proteina u eukariotima je ubikvitinacija i razgradnja u 26S proteasomu.<sup>15</sup> Ubikvitin je visoko konzerviran eukariotski protein koji se sastoji od 76 aminokiselina, a na protein koji je potrebno razgraditi veže se izopeptidnom vezom preko svoje  $\alpha$ -karboksilne skupine Gly76 na  $\epsilon$ -amino skupinu lizina.<sup>19</sup> Kako bi se ubikvitin vezao potrebno ga je aktivirati reakcijom s enzimom E1 koja se provodi u dva koraka. U prvom koraku E1 veže ubikvitin i ATP te katalizira nastanak ubikvitin-AMP intermedijera. U drugom koraku ubikvitin se prebacuje na cisteinski ogranak enzima što rezultira tioesterskom vezom između karboksilne skupine s C-kraja proteina i cisteina. Aktivirani ubikvitin se sada može transtioesterifikacijom prebaciti na cisteinski ogranak ubikvitin-konjugirajućeg enzima E2. Posljednji enzim E3, tj. ubikvitin-ligaza katalizira nastanak izopeptidne veze ubikvitina i  $\epsilon$ -amino skupine lizina ciljanog proteina (Slika 2.a)). Ubikvitinirani protein ima 3 mogućnosti - razgraditi se u kompleksu 26S proteasom, ponovno se ubikvitinirati te zatim razgraditi u proteasomskom kompleksu ili ukloniti ubikvitinski privjesak pomoću deubikvitinirajućih enzima.<sup>4, 20</sup>

26S proteasom prepoznaje ubikvitinski privjesak na proteinima. Navedeni proteasom je multiproteinski kompleks koji se sastoji od dvije strukturne i funkcionalne jedinice, bačvasta 20S katalitička domena i dvije regulatorne 19S domene.<sup>20</sup> Trodimenzionalna struktura proteasoma 26S prikazana je na slici 2.b) i 2.c). 20S domena se sastoji od 4 prstena čije podjedinice okružuju središnju šupljinu u kojoj se razgrađuju proteini, vanjski prstenovi

građeni su od sedam  $\alpha$  podjedinica, a unutarnji su građeni od sedam  $\beta$  podjedinica.<sup>2</sup> Tri od sedam  $\beta$  podjedinica u svakom prstenu posjeduju proteolitičku aktivnost, svaka sa specifičnosti za različite supstrate – hidrofobni, kiseli ili bazični.<sup>15</sup> Dvije 19S domene smještene su s gornje i donje strane 20S domene i sadrže 18 podjedinica proteina. 19S domene služe za prepoznavanje ubikvitiniranih proteina, a šest podjedinica na svakoj domeni su AAA+ ATPaze koje služe za razmatanje i translokaciju proteina u centralnu šupljinu.<sup>2, 15</sup>



Slika 2. a) Tri koraka ubikvitinacije proteina. b) i c) Trodimenzionalna struktura eukariotskog 26S proteasoma. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))

Ovaj put ima bitnu ulogu i u imunosnom sustavu u borbi protiv stanica inficiranih virusom. Proteini iz tih stanica su ubikvitinirani i razgrađeni u specifičnim proteasomima, a nastali kratkolančani peptidi prenose se u endoplazmatski retikulum gdje se vežu za MHC



komplekse (engl. *Major histocompatibility complex*). Kompleksi prenose antigene proteine do membrane gdje ih prepoznaju T limfociti koji zatim pokreću razgradnju svih proteina koji sadrže prepoznati slijed.<sup>4,20</sup>

### 1.2.3. Pupilacija kod bakterija

Jedine bakterije koje sadrže proteasom 20S sličan eukariotskom 26S proteasomu su aktinobakterije. Katalitička domena se sastoji od četiri heptamerna prstena koji zajedno čine bačvastu strukturu. Dva vanjska  $\alpha$  prstena sastoje se od sedam PrcA podjedinica, a unutrašnja dva  $\beta$  prstena sastoje se od sedam PrcB proteina.<sup>21</sup> Za proteolitičku aktivnost zaslužna je hidroksilna skupina treonina s PrcB podjedinica, a specifičnost prema supstratima određuje vezno mjesto koje tvore  $\beta$  podjedinice. Kod eukariota postoji nekoliko vrsta  $\beta$  podjedinica, svaka s različitom specifičnošću prema supstratu, stoga proteasom može hidrolizirati peptidne veze iza aminokiselina bile one hidrofobne, kisele ili bazične. S druge strane kod prokariota postoji samo jedna vrsta  $\beta$  podjedinica, stoga većina 20S proteasoma može cijepati peptidnu vezu samo iza određene vrste aminokiselina (kiselih, bazičnih ili hidrofobnih).<sup>21,22</sup>

Aktinobakterije posjeduju AAA+ ATPaze koje usmjeravaju proteine u razgradnju u proteasomima slično kao 19S regulatorne domene kod eukariota. Ove ATPaze su ciklički homoheksameri, a djeluju tako da uz pomoć centralne šupljine razmataju i translociraju protein za razgradnju.<sup>21,23</sup>

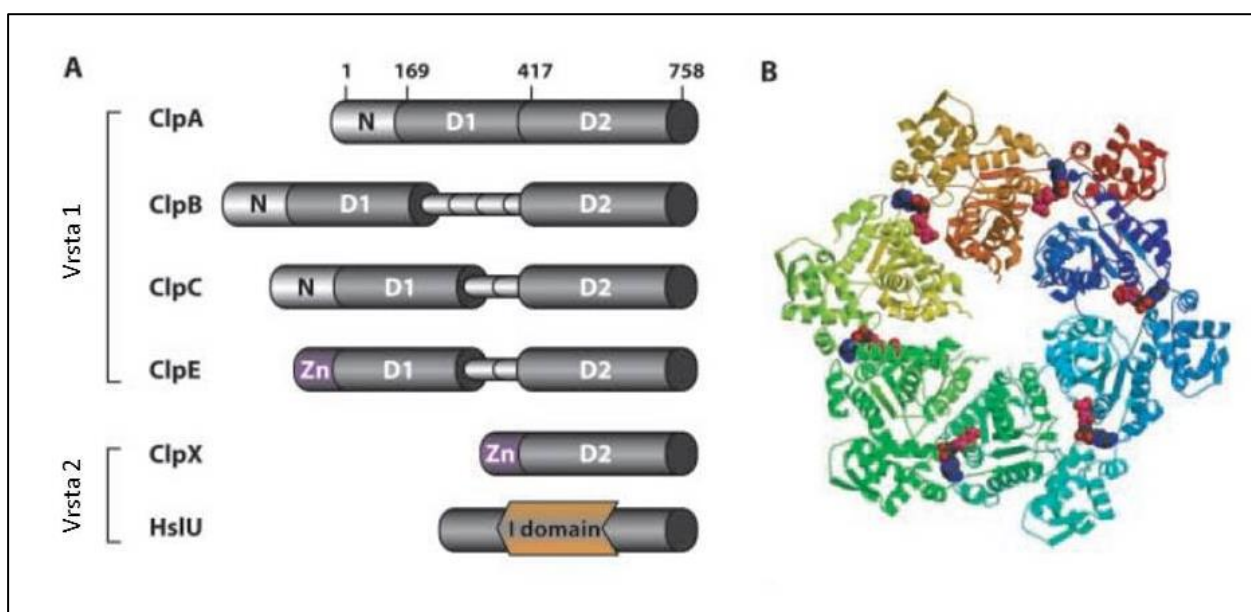
Iako eukarioti i aktinobakterije imaju gotovo jednake proteasomske komplekse, ubikvitin koji označava proteine za razgradnju postoji samo u eukariotskim stanicama. Ipak kod aktinobakterija je pronađen protein Pup (engl. *Prokaryotic ubiquitin-like protein*) koji se sastoji od 64 aminokiseline i funkcijski je analog ubikvitina.<sup>21</sup> Pup svojim C-terminalnim krajem stvara izopeptidnu vezu s lizinom ciljanog proteina te ga tako označava za razgradnju u proteasomu 20S.<sup>22</sup> Za razliku od ubikvitina, Pup ne može stvarati poliPup lance.<sup>22</sup>

### 1.2.4. ATP-ovisne proteaze kod bakterija

I kod bakterija razgradnja proteina se odvija u tri koraka: prepoznavanje supstrata, razmatanje proteina i translokacija u proteolitički aktivan dio peptidaze. U tu svrhu bakterije posjeduju AAA+ ATPaze (engl. *ATPase associated with a variety of cellular activities*) koje se mogu podijeliti u dvije skupine.<sup>23</sup> Prvu skupinu čine proteini koji imaju varijabilnu domenu na N-kraju i dvije domene, D1 i D2, koje vežu nukleotide (NBD), a u tu skupinu ubrajamo ClpA i

ClpB iz gram-negativnih bakterija te ClpC i ClpE iz gram-pozitivnih bakterija.<sup>23,24</sup> Drugu skupinu čine kraći proteini koji sadrže samo jednu domenu za vezanje nukleotida poput ClpX i HslU.<sup>23</sup> Većina ovih ATPaza vezanjem ATP-a polimeriziraju u cikličke strukture, najčešće heksamere (Slika 3).<sup>24</sup>

Najproučavaniji protein iz skupine ATP-ovisnih bakterijskih proteaza je Lon (La) kojeg kodira gen *lon*. Protein posjeduje ATPaznu i proteolitičku aktivnost te katalizira razgradnju mutiranih proteina.<sup>15</sup> Enzim je tetramer i spada u skupinu serinskih proteaza. Zbog ATPazne aktivnosti u strukturi proteina mora postojati  $Mg^{2+}$  da bi se ATP mogao vezati na protein. Vezanje oštećenih proteina potiče hidrolizu ATP-a te za svaku pocijepanu vezu potroše se dvije molekule ATP-a, a još je više potrebno ako u stanici uvjeti nisu optimalni.<sup>25</sup> Hidrolizom ATP-a se ne mijenja struktura supstrata, već dolazi do konformacijske promjene na enzimu. Budući da hidrolizom ATP-a nastaje ADP koji je inhibitor ovog enzima, enzim privremeno postaje inaktivan sve dok ne dođe do disocijacije ADP-a i vezanja novog ATP-a. Određeno je da su u tetrameru dva vezna mjesta visokog afiniteta za ATP i dva vezna mjesta niskog afiniteta iz čega se može zaključiti da se radi o mogućem flip-flop mehanizmu.<sup>25</sup>



Slika 3. a) Raspored domena bakterijskih AAA+ proteina vrste 1 i vrste 2. b) Heksamerna ciklička struktura HslU kakva je prisutna i kod ostalih AAA+ proteina. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (23))

Enzimi poput ClpA, ClpC i ClpX također usmjeravaju proteine u razgradnju, no oni sami nemaju proteolitičku aktivnost već pokreću razgradnju asocijacijom s proteazom ClpP.<sup>24</sup> HslU također na isti način regulira razgradnju vezanjem za HslV.<sup>23</sup> Svi enzimi koji se spajaju s proteazama, osim što aktiviraju proteolitičku funkciju, određuju i specifičnost proteaza prema supstratu.<sup>24</sup> Kompleks ClpA sa ClpP proteazom ima velikih sličnosti s eukariotskim 26S proteasomom. ClpP se sastoji od dva heptamerna prstena koja tvore središnju šupljinu za proteolizu, a sa svake strane smješteni su ClpA heksameri.<sup>24</sup>

Kod AAA+ proteaza susrećemo i proteine adaptore koji utječu na prepoznavanje supstrata za razgradnju tako da se direktno vežu na supstrat i/ili proteazu.<sup>23</sup> Najčešće adaptor protein veže supstrat i prenosi ga do ATPazne domene na proteazi odakle on odlazi u razgradnju. Neki adaptori se razgrađuju zajedno s vezanim proteinima, oni koji se ne razgrađuju moraju se vezati na N-terminalnu domenu proteaze kako ne bi bili prepoznati kao supstrati, ali gdje i dalje mogu regulirati specifičnost.<sup>26</sup> Primjer adaptora je protein MecA koji regulira ClpCP razgradnju tako što C-kraj MecA ima funkciju privjeska za razgradnju i veže se za N-terminalnu domenu ClpC.<sup>23</sup> ClpS je protein adaptor za ClpAS proteazu i cilja proteine koji na N-kraju imaju specifične aminokiseline: fenilalanin, leucin, tirozin ili triptofan.<sup>26</sup>

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Fosforilacija arginina

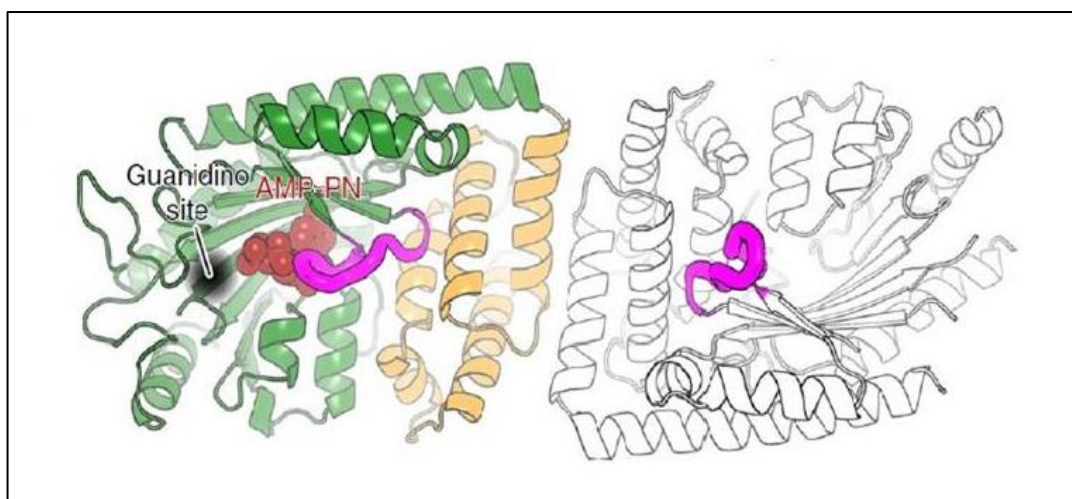
Arginin se može fosforilirati na gvanidijevoj skupini čime nastaje fosfoamidatna veza. Unatoč tehnološkom napretku u polju fosfoproteomike, mnogo manje podataka postoji o fosfoamidatnoj vezi N-P nego što postoji o fosforilaciji serina, treonina i tirozina. Razlog tomu je nestabilnost N-P veze pri niskom pH koji se najčešće koristi tijekom pripreve uzoraka za fosfoproteomsku analizu, osobito pri odjeljivanju proteina pomoću kationske ion-izmjenjivačke kromatografije i kromatografije obratnih faza, stoga velik broj N-fosforiliranih aminokiselina ostane neidentificirano.<sup>7</sup> Prvi fosforilirani arginin otkriven je u proteinu CtsR, a danas je u bakteriji *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* poznato više stotina fosfoarginina<sup>7</sup> koji su se pokazali kao izvrstan primjer signalizacije putem fosforilacije, a povezani su i s odgovorima na promjene u okolini i kontrolom kvalitete proteina. Fosforilaciju arginina katalizira enzim McsB, a povratnu reakciju defosforilacije katalizira fosfataza YwIE.<sup>27,28</sup>

#### 2.1.1. Arginin kinaza McsB

Protein CtsR kod gram-pozitivnih bakterija služi kao represor za gene koji kodiraju HSP100/Clp chaperone i proteazu ClpP zbog čega je navedeni protein iznimno bitan dio kontrole kvalitete bakterijskih proteina. Proteoliza proteina CtsR kada u stanici postoji temperaturni ili oksidativni stres regulirana je pomoću arginin-kinaze McsB.<sup>29,30</sup> Ova kinaza posjeduje sličnost sa fosfagen-kinazama (PhK) te se ranije pretpostavljalo da ima tirozin-kinaznu aktivnost što je opovrgnuto kada su Fuhrman et al. identificirali tri mjesta modifikacije na proteinu CtsR – Arg28, Arg49 i Arg62.<sup>30</sup> Sve tri aminokiseline nalaze se unutar HTH (engl. *helix-turn-helix*) DNA vezne domene i imaju bitne uloge kod vezanja proteina na DNA. Amino skupina bočnog ogranka Arg62 ulazi u mali utor i radi vodikovu vezu s karbonilom s timina, a Arg28 i Arg49 se vežu za purinsku bazu. Istraživanja su pokazala da McsB fosforilira slobodan CtsR protein te na taj način sprječava njegovo vezanje na DNA zavojnicu čime se omogućuje ekspresija *heat-shock* gena.<sup>30</sup>

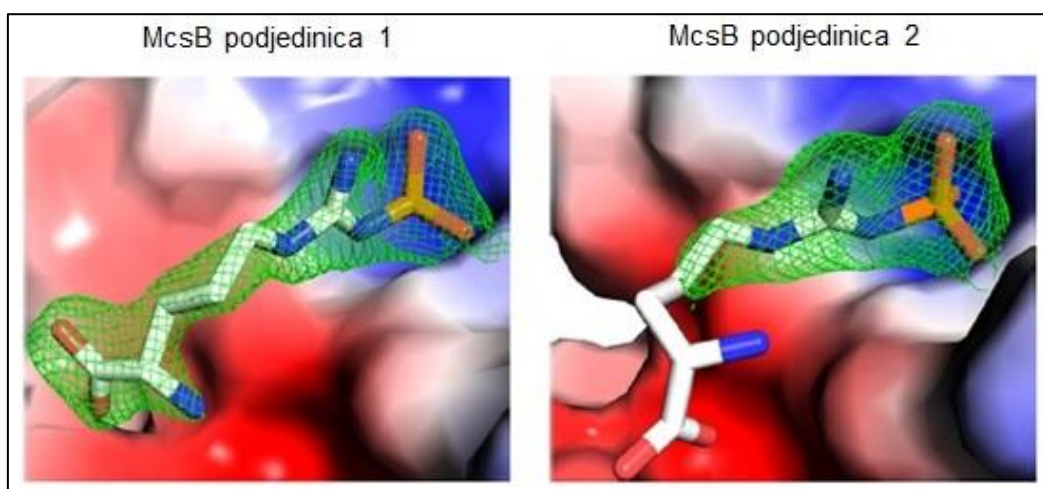
Protein McsB ne pokazuje homologiju ni s jednom poznatom kinazom (serinskom, treoninskom, tirozinskom ili histidinskom), ali katalitička domena pokazuje malu sličnost s katalitičkom domenom PhK (oko 30%).<sup>31</sup> Enzimi PhK uključeni su u održavanje energetske homeostaze te nemaju ulogu u signalizaciji, no rana istraživanja pokazala su da oba enzima koriste slične mehanizme fosforilacije gvanidijevih skupina. Glavna razlika kod ovih enzima je što je specifičnost prema supstratu kod PhK određena N-terminalnom domenom, a kod McsB enzima tu funkciju ima manja C-terminalna domena koja omogućuje vezanje mnogo većih supstrata, odnosno bočnih ogranaka arginina koji se nalaze unutar proteina, za razliku od enzima PhK koji veže slobodni arginin.<sup>30</sup>

Dva enzima u stanici imaju funkciju inhibitora McsB kinaze, protein ClpC i fosfataza YwIE. U normalnim uvjetima u stanici protein ClpC vezan je na kinazu McsB te ju na taj način inhibira. S povišenjem temperature interakcija između proteina ClpC i McsB značajno slabi te nakon disocijacije kinaza McsB se autofosforilira i time postaje aktivna. Mjesta autofosforilacije smještena su unutar C-terminalne domene dok je za katalitičku aktivnost zaslužna N-terminalna domena što znači da autofosforilacija izaziva konformacijsku promjenu koja omogućuje vezanje proteina CtsR za kinazu McsB i fosforilaciju tog proteina. ClpC i YwIE nisu jednako jaki inhibitori. Kada je prisutan samo YwIE, arginin-kinaza i dalje zadržava dio svoje aktivnosti, a kada je inhibirana samo ClpC-om, kinaza McsB gubi gotovo svu aktivnost. Osim toga pokazalo se i da je fosfataza YwIE uvijek prisutna u stanici u aktivnoj formi, neovisno postoji li temperaturni stres ili ne.<sup>29</sup>



Slika 4. Trodimenzionalna struktura arginin-kinaze McsB. Zeleno je označena katalitička ATP:gvanido fosfotransferazna domena PD s aktivnim mjestom, a žuto dimerizacijska domena DD. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (28))

U svojoj nativnoj konformaciji McsB je dimer, a svaka podjedinica sastoji se od dvije domene (Slika 4). N-terminalna domena je katalitička ATP:guanido fosfotransferazna domena (PD) s aktivnim mjestom dok je C-terminalna dimerizacijska domena (DD) i vezane su u redosljedu PD-DD-DD-PD. Katalitička domena sastoji se od antiparalelne  $\beta$ -nabrane ploče koju okružuje sedam  $\alpha$ -zavojnica. U središtu domene nalazi se aktivno mjesto za bočni ogranak arginina, a uz njega je i vezno mjesto za kompleks Mg-ATP.<sup>28</sup> Ključne aminokiseline u aktivnom mjestu su pet arginina koji koordiniraju  $\beta$ - i  $\gamma$ - fosfat ATP-a te dva glutamata i jedan cistein koji pozicioniraju bočni ogranak arginina ciljanog proteina.<sup>28</sup> Ovdje se može uočiti razlika arginin-kinaze i eukariotskih kinaza koje fosforiliraju serin, treonin i tirozin. Ove eukariotske kinaze u aktivnom mjestu imaju samo jedan aspartat koji stvara interakciju s hidroksilnom skupinom aminokiseline koja se fosforilira i tako pozicionira vezani supstrat.<sup>28</sup> Opisani raspored aktivnog mjesta kod McsB može se postići tek nakon vezanja ATP-a što potiče zatvaranje petlje koju čine aminokiseline od 210 do 220. Ovom konformacijskom promjenom se Glu213, jedna od ključnih aminokiselina u aktivnom mjestu, pomakne na mjesto s kojeg može pozicionirati supstrat.<sup>28</sup>



Slika 5. Vezno mjesto za fosfoarginin u dimerizacijskim domenama arginin-kinaze McsB. Plavom bojom označeni su pozitivni bočni ogranci, a crvenom bojom negativni. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (28))

Domena DD sastoji se od četiri  $\alpha$ -zavojnice i jedinstvena je za MscB arginin-kinazu. U domeni je otkriven aminokiselinski slijed RDXXR koji također postoji i na C-kraju proteina CtsR. Taj aminokiselinski slijed tvori džep s bipolarnim razmještajem bočnih ogranaka koji

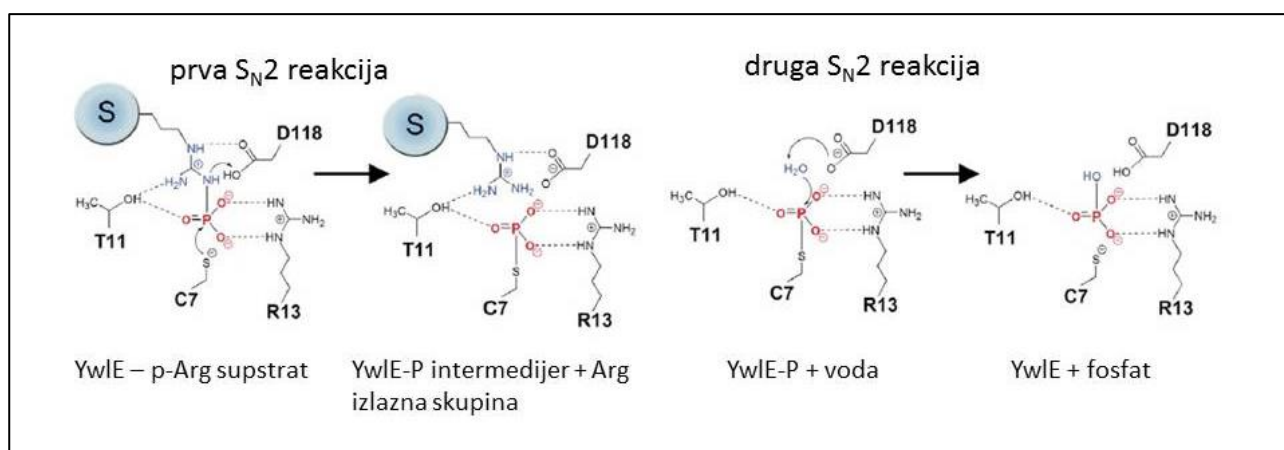
služe za prepoznavanje i vezanje fosforiliranog arginina, karboksilni bočni ogranak služi za vezanje gvanidij skupine, a pozitivni bočni ogranci vežu negativno nabijeni fosfat (Slika 5.). Dokazano je da vezanje proteina koji sadrže fosfoarginin u ovaj bipolarni džep uzrokuje konformacijsku promjenu koja stimulira katalitičku aktivnost enzima što znači da arginin-kinazu MscB alosterički aktiviraju vlastiti produkti.<sup>28</sup>

Proučavanjem aminokiselina oko arginina kojeg MscB fosforilira pokušao se naći aminokiselinski slijed kojeg prepoznaje kinaza, no jedino što se uočilo je učestalost glicina, serina i glutamata u tom području. Na temelju toga donio se zaključak da ne postoji specifični aminokiselinski slijed, ali da su mjesta fosforilacije vrlo često u fleksibilnim regijama proteina. Također, pokazalo se da postoje drugi regulatorni mehanizmi poput vremenske aktivacije ili proteina adaptora kao što je MscA koji ciljaju arginine za fosforilaciju.<sup>7</sup>

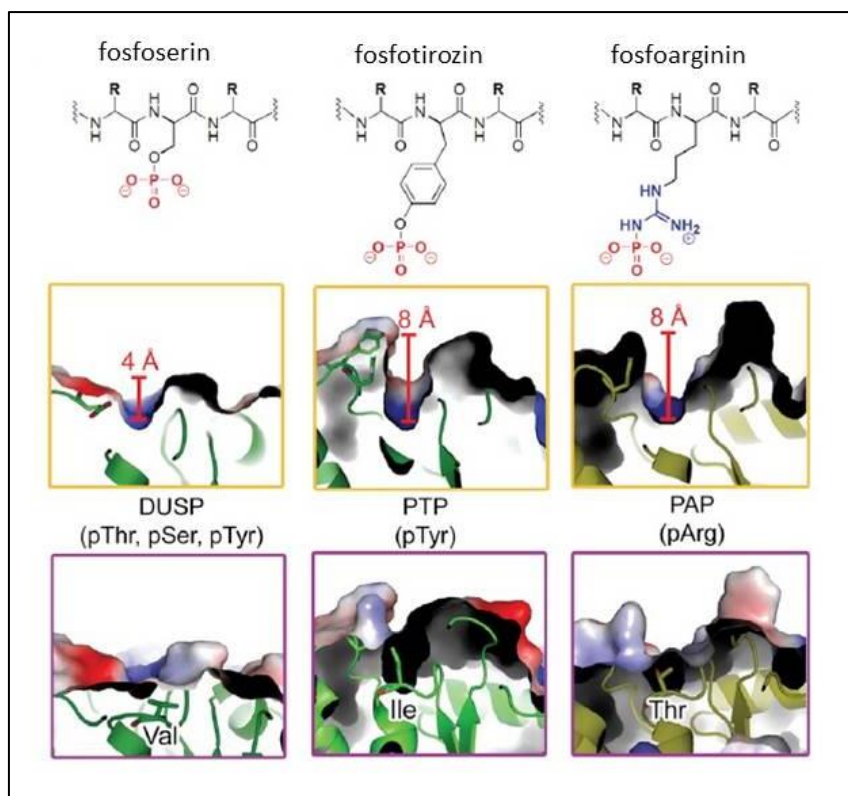
### 2.1.2. Fosfataza YwIE

YwIE je protein arginin-fosfataza koja katalizira defosforilaciju fosfoargininskih bočnih ogranaka proteina. U gram-pozitivnim bakterijama predstavlja enzim suprotan enzimu MscB i njegov je inhibitor, a time i regulira njegovu aktivnost.<sup>29,33</sup> Prema aminokiselinskom slijedu, strukturi i funkciji fosfataze se dijele u tri skupine:

- fosfoprotein-fosfataze (PPP) koje djeluju na serin ili treonin
- $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  ovisne protein-fosfataze (PPM) koje djeluju na serin ili treonin
- protein-tirozin-fosfataze (PTP) koje djeluju na tirozin.<sup>34</sup>



Slika 6. Mehanizam defosforilacije supstrata pomoću YwIE fosfataze. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (34))



Slika 7. Specifičnost fosfataza prema fosfoserinu, fosfotirozinu i fosfoargininu ovisi o aminokiselini na položaju PX5 (Val, Ile ili Thr) u CXXXX5XR omći. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (34))

Fosfataza YwIE prema prethodnoj podijeli spada u protein-tirozin-fosfataze, a sastoji se od centralne paralelne  $\beta$ -nabrane ploče koja je okružena zavojnicama H1, H2, H5 i H6 s jedne strane te zavojnicama H3 i H4 s druge. Sadrži P-omću koja spaja prvi lanac iz  $\beta$ -ploče i zavojnicu H1 te tako tvori aktivno mjesto u kojem su ključne aminokiseline Cys7 i Asp118. Arg13 i pozitivni kraj makrodipola zavojnice H1 čine dno aktivnog mjesta pozitivno nabijenim, a bočni ogranak fosfoarginina sa supstrata smješta se između Thr11, Asp118 i Phe120. Mehanizam defosforilacije sastoji se od dvije  $S_N2$  nukleofilne supstitucije na fosforu. U prvoj reakciji dolazi do prijenosa fosforilne skupine s arginina na Cys7 te nastaje kovalentni fosfocisteinski intermedijer. Zatim dolazi do pomaka arginina iz supstrata 1,5 Å dublje u aktivno mjesto gdje radi didentatne vodikove veze s hidroksilnom skupinom Thr11 i karboksilnom skupinom Asp118, a kut koji nastaje između dušika iz arginina, fosfora iz fosfata i hidroksilne skupine treonina približno je  $180^\circ$  što se poklapa sa  $S_N2$  mehanizmom.



Drugi korak čini hidroliza i otpuštanje fosfata.<sup>34</sup> Shema mehanizma defosforilacije prikazana je na slici 6. Thr11 je iznimno bitan zbog interakcije sa supstratom koja omogućuje precizno pozicioniranje bočnog ogranka u aktivno mjesto. Stoga je određeno da ključnu ulogu u regulaciji selektivnosti supstrata promjenom veličine i naboja aktivnog mjesta ima PX5 iz CXXXX5XR omče te ako je na tom mjestu hidrofilni treonin, supstrat će biti fosfoarginin, a ako se na to mjesto ugradi hidrofobni izoleucin, supstrat će biti fosfotirozin.<sup>34,35</sup>

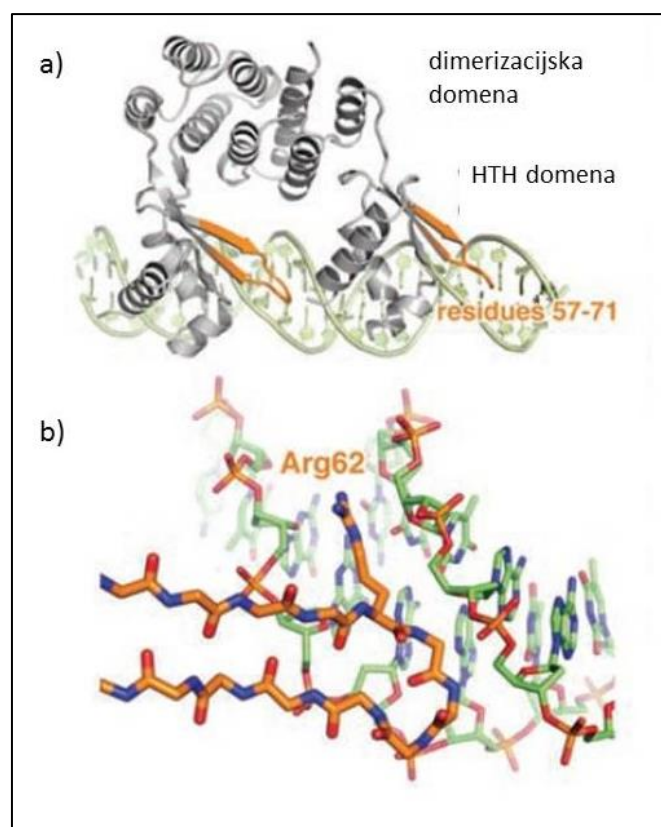
## 2.2. Fosforilacija arginina i proteoliza

Arginin-kinaza McsB ima bitnu funkciju u odgovoru bakterijske stanice na stres, odnosno odgovorna je za regulaciju aktivnosti proteina CtsR koji je represor *heat-shock* gena koji kodiraju proteine staničnog odgovora na toplinski šok poput clpE, clpP i clpC. CtsR ima dimernu HTH (engl. *helix-turn-helix*) strukturu te prepoznaje i veže se na specifičan slijed od sedam nukleotida na DNA zavojnici koji su dio promotorske regije (Slika 8.).<sup>30</sup> Unutar HTH domene postoji tetraglicinska petlja koja povezuje dvije  $\beta$ -nabrane ploče i posjeduje veliku konformacijsku slobodu. Zbog toga joj je smanjena termostabilnost pa tijekom promjena temperature mijenja svoju konformaciju i tako služi kao senzor za temperaturu.<sup>33</sup> Pri povišenim temperaturama dolazi do disocijacije CtsR proteina s DNA čime se omogućuje ekspresija *heat-shock* gena. Kao dodatni regulator aktivnosti kada se stanica nalazi pod stresom koristi se fosforilacija arginina na CtsR-u pomoću McsB kinaze kojom se inhibira represor.<sup>7</sup>

Geni koje regulira CtsR kodiraju proteine čija je funkcija kontrola kvalitete proteina. Npr. ClpC je heksamerni kompleks koji se može kada je aktivan vezati za heptamerni ClpP te tako tvore proteazni kompleks u kojem se proteini označeni fosfoargininom razmataju i razgrađuju. Osim toga, CtsR regulira i ekspresiju gena za CtsR, McsA i McsB. McsA je specifični aktivator koji je potreban za postizanje pune aktivnosti kinaze McsB, a njegovo vezanje na kinazu rezultira fosforilacijom oba proteina McsA i McsB.<sup>7</sup>

Sljedeća razina regulacije je fosfataza YwIE koja ima suprotnu aktivnost od McsB i inhibira ju. Uz YwIE, regulator McsB kinaze je i ClpC, a djeluje na način opisan gore (stranica 13.). ClpC se ističe od ostalih proteina zbog velikog broja identificiranih fosfoarginina, čak njih 12, što je objašnjeno time što McsB radi kompleks s McsA i ClpC u fiziološkim uvjetima, a u uvjetima staničnog stresa interakcija između McsB i ClpC slabi.

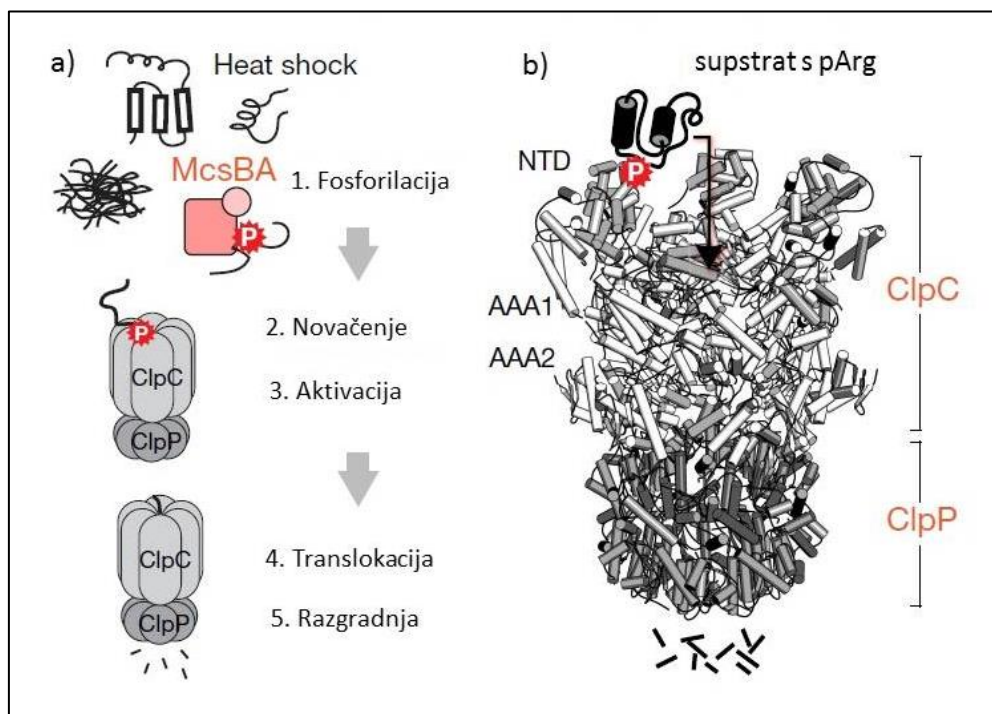
Nakon disocijacije i kinaza McsB i ClpC postaju aktivni. Aktivni oblik ClpC proteina je heksamerni kompleks kojeg formira uz pomoć proteina adaptoru MecA. Većina fosfoarginina kod kompleksa nalaze se u unutrašnjosti dok su kod monomera raspoređeni po površini proteina iz čega se može zaključiti da je McsB vezan samo na inaktivni monomerni oblik ClpC proteina.<sup>7,29</sup>



Slika 8. a) Vrpčasti prikaz CtsR dimera (sivo) vezanog na DNA (zeleno). b) Vezanje Arg62 iz CtsR u mali utor DNA zavojnice. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (30))

McsB kao arginin-kinaza fosforilira velik broj proteina u stanici i time ih označava za proteolizu unutar ClpCP proteaznog kompleksa. U gram-pozitivnim bakterijama ClpCP proteaza je važan proteolitički sustav, a sastoji se od aktivnog heksamernog kompleksa ClpC koji se veže na dva heptamerna prstena ClpP proteina koji tvore proteolitičku centralnu šupljinu. Centralna šupljina sadrži ukupno 14 proteolitičkih mjesta koja su odvojena od citosola (Slika 9.). ClpC kompleks je zadužen za razmatanje i translokaciju proteina u

proteolitičku šupljinu uz utrošak ATP-a. McsB također ima i funkciju proteina adaptora za ClpC i stimulira njegovu ATPaznu aktivnost.<sup>32</sup>



Slika 9. a) Prikaz fosforilacije i razgradnje proteina u kompleksu ClpCP  
 b) Strukturni prikaz ClpCP kompleksa. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (32))

Iako postoji znatna razlika u veličini „privjeska“, ubikvitinacija i fosforilacija arginina proteina kao oznake za razgradnju dijele određene karakteristike. Oba procesa su posttranslacijske modifikacije proteina zbog čega su mehanizmi regulacije oba procesa precizniji i brži. Nadalje, 19S regulatorna domena 26S proteasoma posjeduje specifična vezna mjesta kao što i heksamer ClpC posjeduje receptorska mjesta na N-terminalnoj domeni. Obje kovalentne modifikacije destabiliziraju proteine, kod fosforilacije arginina do destabilizacije dolazi zbog izmjene naboja zbog čega se narušavaju elektrostatske interakcije u proteinu. Ali i jedan i drugi proces su povratni, ubikvitinirani proteini se mogu vratiti u normalno stanje deubikvitinacijom isto kao što fosforilirani proteini mogu ukloniti modifikaciju defosforilacijom pomoću fosfataze YwLE. Na temelju svih sličnosti može se reći da je fosforilacija arginina i ClpCP kompleks manja i jednostavnija verzija ubikvitinacije i 26S proteasoma.<sup>7,32</sup>

Fosforilacija arginina nema samo regulatornu ulogu u inhibiciji CtsR proteina, već je bitna i za održavanje funkcije proteina tijekom temperaturnog, oksidativnog ili drugog stresa, a povećane količine fosfoarginina pronađene su i kod agregata. Također, većina proteina sadrži mjesta za fosforilaciju u regijama gdje se smataju u određene sekundarne strukture i motive kako bi, ako dođe do oštećenja, lako i brzo uklonili te proteine što je i potvrđeno istraživanjima. Nakon što se uklonila McsB kinaza iz stanice došlo je do nakupljanja velikog broja agregata, nepravilno smotanih ili oštećenih proteina.<sup>7,32</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto Jr., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44(45)** (2005) 7342-7372.
2. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, 2017
3. E. S. Witze, W. M. Old, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Nat. Methods.* **4(10)** (2007) 798-806.
4. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, 2007
5. Y. L. Deribe, T. Pawson, I. Dikic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17(6)** (2010) 666-672.
6. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, 2011
7. A. Schmidt, D. Broch Trentini, S. Spiess, J. Fuhrmann, G. Ammerer, K. Mechtler, T. Clausen, *Mol. Cell. Proteomics* **13(2)** (2014) 537-550.
8. P. Cohen, *Trends Biochem. Sci.* **25(12)** (2001) 596-601.
9. J. Cieśla, T. Frączyk, W. Rode, *Acta Biochim. Pol.* **58(2)** (2011) 137-148.
10. A. Sickmann, H. E. Meyer, *Proteomics* **1(2)** (2001) 200-206.
11. P. A. Levene, C. L. Alsberg, *J. Biol. Chem.* **2** (1906) 127-133.
12. G. Burnett, E. P. Keneddy, *J. Biol. Chem.* **211(2)** (1954) 969-980.
13. T. Hunter, *Cell* **80(2)** (1995) 225-236.
14. T. Pawson, J. D. Scott, *Trends Biochem. Sci.* **30(6)** (2005) 286-290.
15. A. L. Goldberg, *Nature* **426(6968)** (2003) 895-899.
16. A. Ciechanover, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6(1)** (2005) 79-87.
17. A. L. Goldberg, J. F. Dice, *Annu. Rev. Biochem.* **43(0)** (1974) 835-869.
18. C. de Duve, *The Lysosome Concept*, Ciba Foundation, 1963
19. M. Hochstrasser, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7(2)** (1995) 214-223.
20. M. Hochstrasser, *Annu. Rev. Genet.* **30** (1996) 405-439.
21. J. B. Jastrab, K. Heran Darwin, *Annu. Rev. Microbiol.* **69** (2015) 109-127.
22. L. M. Iyer, A. M. Burroughs, L. Aravind, *Biol. Direct* **3** (2008) 45-51.
23. D. A. Dougan, A. Mogk, B. Bukau, *Cell. Mol. Life. Sci.* **59(10)** (2002) 1607-1616.
24. E. C. Schirmer, J. R. Glover, M. A. Singer, S. Lindquist, *Trends Biochem. Sci.* **21(8)** (1996) 289-296.
25. A. L. Goldberg, *Eur. J. Biochem.* **203(1-2)** (1992) 9-23.

26. A. Battesti, S. Purvis, *Curr. Opin. Microbiol.* **16** (2013) 140-147.
27. P. G. Besant, P. V. Attwood, M. J. Piggot, *Curr. Protein Pept. Sci* **10(6)** (2009) 536-550.
28. M. J. Suskiewicz, B. Hajdusits, R. Beveridge, A. Heuck, L. D. Vu, R. Kurzbauer, K. Hauer, V. Thoeny, K. Rumpel, K. Mechtler, A. Meinhart, T. Clausen, *Nat. Chem. Biol.* **15(5)** (2019) 510-518.
29. A. K. Elsholz, K. Hempei, S. Michailk, K. Gronau, D. Becher, M. Hecker, U. Gerth, *J. Bacteriol* **193(15)** (2011) 3887-3893
30. J. Fuhrmann, A. Schmidt, S. Spiess, A. Lehner, K. Turgay, K. Mechtler, E. Charpentier, T. Clausen, *Science* **324(5932)** (2009) 1323-1327
31. M. J. Suskiewicz, T. Clausen, *Cell Chem. Biol.* **23(8)** (2016) 888-890.
32. D. B. Trentini, M. J. Suskiewicz, A. Heuck, R. Kurzbauer, L. Deszez, K. Mechtler, T. Clausen, *Nature* **539(7627)** (2016) 48-53.
33. A. K. Elsholz, S. Michailk, D. Zühlke, M. Hecker, U. Gerth, *EMBO J.* **29(21)** (2010) 3261-3269.
34. J. Fuhrmann, B. Mierzwa, D. B. Trentini, S. Spiess, A. Lehner, E. Charpentier, T. Clausen, *Cell Rep.* **3(6)** (2013) 1832-1839.
35. D. B. Trentini, J. Fuhrmann, K. Mechtler, T. Clausen, *Mol. Cell. Proteomics* **13(8)** (2014) 1953-1964.