

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Jan Kýr

Funkce šaperonu ClpX u bakterií
The function of ClpX chaperone in bacteria

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Gabriela Balíková Novotná, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 8.6. 2020

.....

Jan Kýr

Poděkování

Tímto bych chtěl především poděkovat své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a připomínky poskytnuté v průběhu sepisování této práce. V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat své rodině a přátelům za jejich ohromnou podporu, které se mi dostávalo v průběhu celého studia.

Abstrakt:

Intracelulární proteolýza je základní regulační proces ovlivňující buněčnou fyziologii. Jelikož proteolýza nevratně ničí proteiny, je nutné, aby byl tento proces přísně kontrolován. U bakterií jsou základními kameny regulované proteolýzy AAA+ proteiny. Tyto proteiny se skládají ze dvou funkčních domén a to AAA+ šaperonové domény a proteázové domény. Jednou skupinou těchto AAA+ proteinů je rodina Clp proteinů, u které jsou funkční domény tvořeny samostatnými proteiny. Jedním z těchto proteinů je hexamerická AAA+ unfoldáza ClpX. Tato unfoldáza může interagovat s vysoce konzervovanou proteázou ClpP za tvorby proteolytického komplexu ClpXP. Tento proteolytický komplex využívá energii vazby ATP a jeho hydrolýzu k rozbalení a translokaci specificky značeného substrátu do degradační komory ClpP. Rozpoznání substrátu je zprostředkováno vazbou ClpX na krátké nestrukturované sekvence nazývané degradační značky. ClpX rozpoznává velké množství degradačních značek, avšak nejzásadnější je rozpoznání ssrA degradační značky, která je výstupem tmRNA systému záchrany ribozomu. I když ClpX ve spojení ClpP ovlivňují celou řadu buněčných pochodů, jako je exprese virulentních faktorů či adaptace na stresové faktory, ClpX zastává i role zcela nezávislé na ClpP. Mezi takové role patří například regulace exprese proteinu Rot, který je zodpovědný za produkci jednoho z hlavních virulentních faktorů stafylokoků proteinu A. Jelikož se ClpX i ClpP velkou měrou podílí na produkci virulentních faktorů, jeví se jako ideální alternativní cíl pro vývoj nových antimikrobiálních látek, které mohou být cílem k obnovení citlivosti rezistentních bakterií.

Klíčová slova

AAA+ proteázy, ClpX, ClpP, ClpXP, funkce, struktura, bakterie, virulence, fyziologie

Abstract

Intracellular proteolysis is an essential regulatory process that affects cellular physiology. Since proteolysis destroys proteins irreversibly, this process must be strictly controlled. The AAA+ proteins are the key factors in regulated proteolysis in bacteria. These proteins consist of two functional domains, the AAA+ chaperone domain and the protease domain. One particular group of these AAA+ protein is the Clp protein family. Functional domains of the Clp family are formed by separate proteins. The hexameric unfoldase ClpX is a member of this protein family. This unfoldase can interact with the highly conserved ClpP protease to form a ClpXP proteolytic complex. This proteolytic complex utilizes the energy of ATP binding and hydrolysis to unfold and translocate the specifically tagged substrate into the ClpP degradation chamber. Substrate recognition is mediated by the binding of ClpX to short unstructured sequences called degradation tags. ClpX recognizes several degradation tags, but the most important one is recognition of the *ssrA* degradation tag, which is the output of the tmRNA ribosome rescue system. Although ClpX interacts with ClpP, it affects a variety of cellular processes such as the expression of virulence factors or the adaptation to stress factors, ClpX can work independently of ClpP. Such roles include for example the regulation of the Rot protein expression. Rot is responsible for the production of the major staphylococci virulence factor protein A. Since ClpX and ClpP are involved in the production of virulence factors, it appears that they could be an ideal alternative target for the development of new antimicrobial substances that can be targeted to restore the sensitivity of the resistant bacteria.

Key words

AAA+ proteases, ClpX, ClpP, ClpXP, function, structure, bacteria, virulence, physiology

Přehled použitých zkratk

AAA+	ATPases Associated with various cellular Activities +	ATPázy spojené s různými buněčnými aktivitami +
ABCF	ATP-binding cassette subfamily F	ATP-vazebná podrodina F proteinů
ADEP	acyldepsipeptide	acyldepsipeptid
ADP	Adenosine diphosphate	Adenosindifosfát
Agr	Accessory gene regulator	Regulátor doplňkových genů
AIP	Autoinducing peptide	Autoindukující peptid
AMR	Antimicrobial resistance	Antimikrobiální rezistence
ATM	Antimicrobial substance	Antimikrobiální látka
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
ATP*	State primed to hydrolyze ATP	Stav připravený k hydrolyze ATP
Å	Ångström	Ångström
Clp	Caseinolytic proteins	Kaseinolytický protein
ClpA	Caseinolytic protease subunit A	Kaseinolytická proteázová podjednotka A
ClpC	Caseinolytic protease subunit C	Kaseinolytická proteázová podjednotka C
ClpE	Caseinolytic protease subunit E	Kaseinolytický proteázová podjednotka E
ClpP	Caseinolytic protease proteolytic subunit	Kaseinolytická proteázová proteolytická podjednotka
ClpX	Caseinolytic protease subunit X	Kaseinolytická proteázová podjednotka X
ClpX- eYFP	ClpX tagged with yellow fluorescent protein	ClpX značené žlutým fluorescenčním proteinem
ClpX ^{ΔN}	Caseinolytic protease subunit X without N-terminal zinc binding domain	Kaseinolytická proteázová podjednotka X bez N-koncové zinek vazebné domény
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
EF-Tu	elongation factor Tu	elongační faktor Tu
EM	Electron microscopy	Elektronová mikroskopie
ESR	Envelope Stress Response	Reakce na stresový faktor buněčného obalu
FtsH	Filamentous temperature-sensitive H peptidase	Filamentární na teplotu citlivá peptidáza H
GDP	Guanosine diphosphate	Guanosindifosfát
GFP	Green fluorescent protein	Zelený fluorescenční protein
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosintrifosfát

HslU	Heat shock locus gene U	Gen lokusu tepelného šoku U
HslUV	Heat shock locus gene U and V	Gen lokusu tepelného šoku U a V
HslV	Heat shock locus gene V	Gen lokusu tepelného šoku V
IraD	Anti-adapter protein IraD	Anti-adapterový proteín IraD
IraM	Anti-adapter protein IraM	Anti-adapterový proteín IraM
IraP	Anti-adapter protein IraP	Anti-adapterový proteín IraP
K _M	Michaelis konstante	Michealisova konstanta
Lon	AAA+ ATPáza named after gene mutants of <i>E. coli</i> that forms <u>long</u> undivided filaments upon UV irradiation	AAA+ ATPáza pojmenované po mutantu v genu <i>E. coli</i> který tvořil dlouhá nerozdělená filamentová vlákna po vystavení UV záření
LTA	Lipoteichoic acid	Lipoteichoová kyselina
<i>ltaS</i>	Lipoteichoic acid synthase	Syntetáza lipoteichoové kyseliny
MLD	mRNA-like domain	mRNA podobná doména
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
Msr(A)	Methionine Sulfoxide Reductase A	Methionin-sulfoxid reduktáza A
N-RseA	N-terminal residue of RseA	N-koncový fragment RseA
OmpA	Outer membrane protein A	Vnější membránový protein A
RNA	Ribonucleic acid	Ribonuklová kyselina
Rot	Repressor of toxins	Represor toxinů
RseA	Anti- σ^E factor RseA	Anti- σ^E faktor RseA
RssB	Regulator of RpoS	Regulátor RpoS
SarA	Staphylococcal accessory regulator A	Stafylokokový doplňkový regulátor A
SarS	Staphylococcal accessory regulator S	Stafylokokový doplňkový regulátor S
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Dodecylsírán sodný
SmpB	Small protein B	Malý protein B
<i>spa</i>	Staphylococcal protein A	Stafylokokový proteín A
SR-SIM	Superresolution Structured Illumination Microscopy	Superrezoluční mikroskopie se strukturovaným osvětlením
SspB	Stringent starvation protein B	Stringentní hladem indukovaný proteín B
ssrA	Proteolysis tag encode by tmRNA	Degradační značka kodovaná tmRNA
tmRNA	transfer-messenger RNA	transferová –mediátorová RNA
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
ZBD	Zinc-binding domain	Zinek-vazebná doména

Obsah

1	Úvod	1
2	Objev a raný výzkum ClpX	3
3	Struktura a mechanismus působení proteolytického komplexu ClpXP .	4
3.1	Struktura proteolytického komplexu ClpXP.....	4
3.1.1	Struktura ClpP	4
3.1.2	Struktura ClpX.....	5
3.1.3	Interakce mezi ClpX a ClpP potřebné pro zformování proteolytického komplexu ClpXP.....	7
3.2	Mechanismus působení ClpXP a jeho role při kontrole hladiny proteinů v buňce	9
3.2.1	Rozpoznání substrátu	9
3.2.2	Adaptory zprostředkovaná degradace substrátu	10
3.2.3	tmRNA systém	13
3.2.4	Rozbalení a translokace substrátu určeného k degradaci pomocí ClpXP.....	14
4	Vliv ClpX a ClpP na fyziologii a virulenci u <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4.1	Vliv ClpXP a ClpX na virulenci u <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4.1.1	Působení ClpX na produkci proteinu A	18
4.2	ClpX ovlivňuje buněčnou fyziologii a stresovou toleranci <i>S. aureus</i>	19
4.3	ClpX jako faktor podílející se na tvorbě septa u <i>S. aureus</i> a jeho možný vliv na transkripci genů zodpovědných za buněčné dělení.....	21
5	Funkce ClpX nezávislá na ClpP u jiných bakterií	23
5.1	ClpX jako faktor virulence u <i>Bacillus anthracis</i> a <i>Streptococcus suis</i> sérotypu 2	23
5.2	Vliv ClpX na tvorbu biofilmu, buněčnou adhezi, virulenci a stresovou toleranci u <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	24
6	ClpX a ClpP jako nový cíl antimikrobiálních látek k obnovení citlivosti rezistentních patogenů	25
7	Závěr	26
8	Přehled použité literatury	27

1 Úvod

Většina bakterií žije v dynamickém prostředí, kde se mění teplota, dostupnost živin a chemické složení. Pro přežití v takto dynamických podmínkách je nezbytné se umět rychle adaptovat. Většina adaptivních změn probíhá na úrovni transkripce, která je řízena globální regulační sítí, ale tato adaptační odpověď je pomalá. Většina bakteriálních proteinů je stabilní a jejich koncentrace v buňce je i po zpomalení transkripce vysoká, z toho důvodu je klíčem k rychlé adaptivní odpovědi proteolýza (Gur et al. 2011).

Intracelulární proteolýza je základní proces, který reguluje genovou expresi, odstraňuje špatně složené proteiny vznikající během syntézy polypeptidového řetězce nebo při stresu vyvolaném vnějšími podněty, a udržuje v buňce homeostázy (Gur et al. 2011; Powers a Balch 2013; LaBreck et al. 2017). Důležitost proteolýzy je zdůrazněna faktem, že alespoň jedna proteáza se vyskytuje ve všech živých buňkách a že mutanty, které postrádají jednu či více proteáz vykazují růstové defekty (Gur et al. 2011). Jelikož proteolýza nevratně rozkládá proteiny, je pro buňku důležité, aby byl tento mechanismus maximálně selektivní a nedocházelo k nespecifické degradaci nebo k opomenutí špatně sbaleného, či jinak poškozeného proteinu. To by mohlo mít pro buňku fatální následky. Z toho důvodu je proteolýza pečlivě regulovaným procesem (Maxson & Mitchell 2018).

Regulace proteolýzy je u bakterií realizována AAA+ (ATPázy spojené s různými buněčnými aktivitami) proteázami. Všechny AAA+ proteázy se skládají ze dvou domén, substrát vazebné ATPázové šaperonové domény (ATPázová doména) a proteázové domény (LaBreck et al. 2017). Aktivní degradační místa proteázové domény se vyskytují uvnitř kompaktní struktury formující proteolytickou komoru (Wang et al. 1997). Pro vstup do proteolytické komory musí substrát nejprve projít skrz regulační ATPázovou doménu, která svojí strukturou tvoří pór příliš úzký na to, aby jím složené proteiny procházeli pouhou difúzí (Gur et al. 2011).

AAA+ proteázy pro svou funkci vyžadují energii hydrolýzy molekul ATP. Po rozpoznání substrátu ATPázovou doménou je vzniklá energie hydrolýzy ATP využita k rozbalení a translokaci substrátu do proteolytické komory, kde je posléze degradován. Bylo prokázáno, že u bakterií se vyskytuje několik tříd těchto AAA+ proteáz: Lon, FtsH, HslUV, ClpAP, ClpCP, ClpEP a ClpXP (Maxson & Mitchell 2018).

Narozdíl od ostatních AAA+ proteáz mají proteázy Lon a FtsH obě domény na jednom polypeptidovém řetězci, který se skládá do homohehexameru tvořící strukturu barelu (Maxson & Mitchell 2018).

Funkční domény AAA+ proteáz rodiny Clp jsou tvořeny dvěma samostatnými proteiny a to AAA+ ATPázovou doménou a serinovou proteázou ClpP. Odlišné hexamerické ATPázové domény (ClpA, ClpX, ClpC, ClpE), které rozeznávají rozdílné substráty, interagují se společnou tetradekamerární peptidázovou doménou ClpP a tím tvoří proteolytické komplexy (ClpAP, ClpXP, ClpCP a ClpEP) (Maxson & Mitchell 2018). ClpP je příkladem jednoho z hlavních proteolytických proteinů bakterií, který má na starosti udržení proteinové homeostázy. ClpP je vysoce konzervovanou serinovou proteázou, je esenciální pro virulenci a regulaci stresových reakcí u několika patogenních bakterií. To z něj dělá slibný cíl pro vývoj nových antibiotik (Wang et al. 1997; Grimaud et al. 1998; Gaillot et al. 2000; Moreno-Cinos et al. 2019).

Kromě důležité role v proteolytických komplexech mají ATPázové Clp domény také různé funkce nezávislé na ClpP. Ty mají značný vliv na fyziologii buněk odlišných bakteriálních druhů (Wickner et al. 1994; Levchenko et al. 1995; Jensen et al. 2019b; Lo et al. 2019). Podobné složení jako AAA+ proteázy rodiny Clp má i proteáza HslUV. Ta je tvořena spojením dodekamerické proteolytické domény HslV s hexamerickou ATPázovou doménou HslU (Gur et al. 2011).

I přes strukturní podobnosti se tyto proteázy od sebe liší variabilitou rozeznávaných značek (degronů), které slouží k označení proteinů určených k degradaci, a také specifitou se kterou degrony váží. Jakmile je substrát rozpoznán AAA+ ATPázovou doménou, je velmi rychle degradován. Samotné rozpoznání substrátů může být inhibováno nebo aktivováno různými faktory či samotnými substráty v závislosti na potřebách buňky jakými jsou např. kontrola kvality proteinů, udržování proteinové homeostázy během přechodů mezi růstovými fázemi. (Maxson & Mitchell 2018).

Studium proteáz může vést k vývoji nových strategií v boji proti infekčním chorobám. Například bylo zjištěno, že ClpX a ClpP mají roli v regulaci virulence u lidského patogena *Staphylococcus aureus* (Frees et al. 2005; Maxson & Mitchell 2018) a mohou být také klíčem k obnově citlivosti rezistentních bakterií (Gersch et al. 2015). ClpX nezávisle na ClpP interferuje s telithromycinovou rezistencí udílenou ABCF proteinem Msr(A) u *Staphylococcus aureus*, avšak mechanismus interference je neznámý (Vimberg et al. 2015). Pro pochopení tohoto jevu je potřebné zpracovat dostupné znalosti o ClpX, což je i cílem této práce.

2 Objev a raný výzkum ClpX

První práce o AAA+ proteázách byly publikovány pozdních 80. letech, kdy byla izolována nová dvoukomponentová ATP dependentní proteáza ClpAP (Katayama-Fujimura et al. 1987; Byung Joon Hwang et al. 1988; Katayama et al. 1988). Bylo popsáno, že se skládá ze dvou komponent. Komponenty ClpA vykazující vnitřní ATPázovou aktivitu a komponenty ClpP. U druhé komponenty ClpP bylo zjištěno, že ačkoliv obsahuje serinové aktivační místo, tak nevykazuje žádnou proteolytickou aktivitu bez přítomnosti ClpA, Mg^{+2} a ATP (Katayama-Fujimura et al. 1987; Katayama et al. 1988; Byung Joon Hwang et al. 1988). Později však bylo zjištěno, že samotné ClpP vykazuje slabou degradační aktivitu vůči krátkým peptidovým řetězcům. Avšak pro degradaci proteinů, či některých peptidů, je nezbytná přítomnost ClpA (Thompson et al. 1994).

Na počátku 90. let, při studiu proteáz schopných degradovat velice nestabilní λ 0 fágový DNA replikační protein, byla objevena dosud neznámá dvoukomponentová AAA+ proteáza, která se skládala z již známé proteázy ClpP a dosud neznámé ATPázy. Tato nově objevená ATPáza byla pojmenována na základě shody koncové aminokyselinové sekvence genu *clpX*. Ukázalo se, že ClpX vykazuje mírnou sekvenční homologii k ClpA a ostatním členům Clp rodiny (Gottesman et al. 1993; Wojtkowiak et al. 1993). Brzy však bylo zjištěno, že ClpAP i ClpXP degradují rozdílné substráty. Tento fakt poukázal na to, že ATPázové domény (ClpA, ClpX) Clp proteolytického komplexu jsou zodpovědné za rozpoznání substrátu (Mhammedi-Alaoul et al. 1994; Wickner et al. 1994). Mechanismus rozpoznání substrátu těmito proteiny je již v dnešní době důkladně prozkoumán viz. kapitola 3.2.1

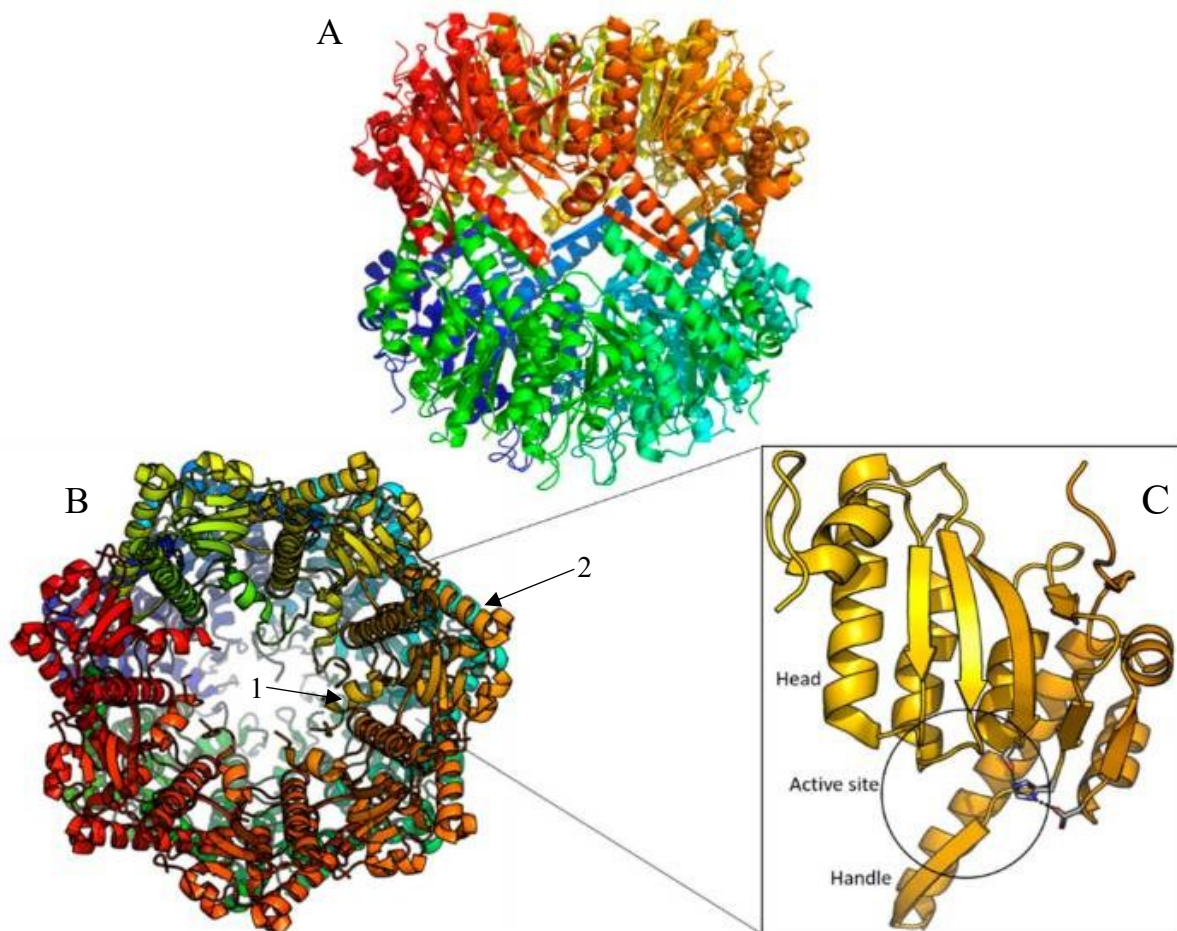
Dalším důležitým objevem bylo, že ClpX dokáže působit nezávisle na proteáze ClpP, v dráze replikativní transpozice bakteriofága Mu (Mhammedi-Alaoul et al. 1994). Později byl tento protein purifikován jako enzym, který je potřebný k odstranění MuA transpozázy z DNA po rekombinaci. Odstranění transpozázy je velice důležitým krokem mezi rekombinací a replikací Mu fágové DNA a probíhá mechanismem ATP závislé změny konformace proteinu. Z tohoto důvodu se ClpX může považovat za molekulární šaperon (Levchenko et al. 1995; Kruklytis et al. 1996).

3 Struktura a mechanismus působení proteolytického komplexu ClpXP

3.1 Struktura proteolytického komplexu ClpXP

3.1.1 Struktura ClpP

ClpP asociuje s několika AAA+ šaperony, jako je ClpX, ClpA a ClpC. Ve spojení s těmito šaperony tvoří proteolytický komplex. ClpP má strukturu tetradekamerického válce, který se skládá ze dvou heptamerických prstencových podjednotek spojených zády k sobě. Axiální pór obou podjednotek, který dosahuje přibližně průměru 10Å, je kontrolním místem pro vstup do proteolytické komory. Proteolytická komora, s průměrem přibližně 51Å, obsahuje 14 aktivních míst. Všechna aktivní místa jsou tvořena katalytickou triádou Ser-His-Asp. Monomery podjednotek ClpP jsou tvořeny N-koncovou smyčkou, C-koncovou smyčkou, „head“ doménou a „handle“ doménou (Obrázek 1) (Wang et al. 1997).

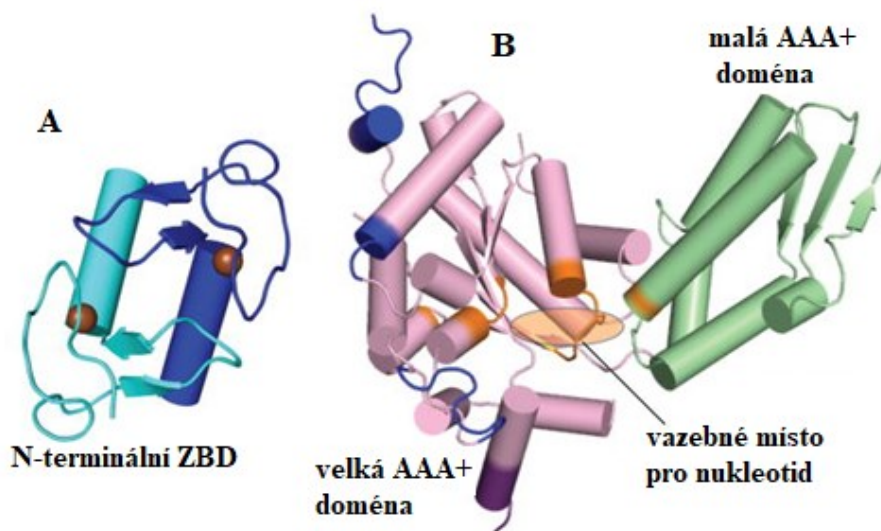


Obrázek 1: Struktura ClpP z *Escherichia coli* (A): Tetradekamer ClpP při pohledu ze strany. (B) Tetradekamer ClpP při pohledu z vrchu. (1) head doména tvořící hlavní tělo prstence, je orientována do vnitřní části barelu. (2) handle doména interaguje se sousední handle doménou druhého prstence a vytváří rozhraní, které má vliv na zformování tetradekameru. (C) struktura monomeru ClpP s vyznačeným aktivním místem v kruhu. – (upraveno: Moreno-Cinos et al. 2019)

3.1.2 Struktura ClpX

ClpX se skládá ze dvou podjednotek, a to specifické N–koncové zinek–vazebné domény (ZBD) a AAA+ modulu, který se skládá z velkých a malých AAA+ domén tvořící strukturu hexamerického prstence (Singh et al. 2001; Donaldson et al. 2003; Kim a Kim 2003).

Orientace AAA+ domén však není zcela symetrická v celém komplexu. Tento jev je způsoben vazbou ATP nebo ADP na různé podjednotky. Jelikož se jedná o velice rigidní strukturu, tak vazba jedné molekuly nukleotidu do vazebného místa vyvolá konformační změny, které se promítnou napříč celým proteinem. Nukleotid se váže do žlábků, který se nachází na spojení velké a malé AAA+ domény (Obrázek 2) (Kim a Kim 2003; Glynn et al. 2009).



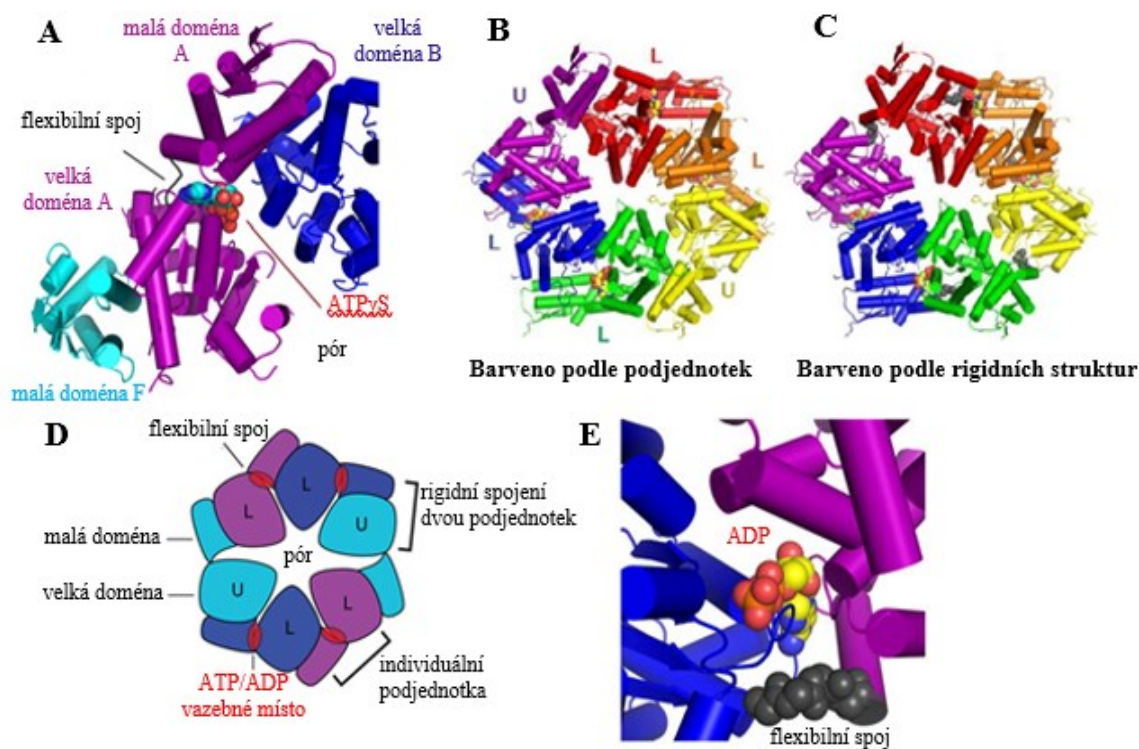
Obrázek 2: Struktura podjednotek ClpX, (A) Struktura dimeru N–koncové ZBD, kde kuličky značí atomy zinku. (B) Struktura AAA+ modulu jako jedné podjednotky ClpX s vyznačeným místem pro vazbu nukleotidu. – (upraveno Baker a Sauer 2012)

ZBD tvoří dimer, kde každá z jeho podjednotek je stabilizována atomem zinku. Skládá se nezávisle na AAA+ modulu a vyskytuje se na periférii ClpX (Singh et al. 2001; Donaldson et al. 2003). Ze studií provedených na proteinech ClpX a ClpX bez N–koncové domény (ClpX^{ΔN}) vyplývá, že pro správné sestavení hexameru není vyžadována přítomnost ZBD (Singh et al. 2001; Wojtyra et al. 2003). Zajímavé je, že ClpX^{ΔN} se váže na ClpP s podobnou afinitou jako divoký typ ClpX a je schopný ATP dependentní degradace některých proteinů (Wojtyra et al. 2003). Z toho vyplývá, že AAA+ modul může za mechanickou funkci ClpX. Naproti tomu ZBD je zodpovědná za rozpoznání, napojení několika substrátů a přispívá ke stabilizaci hexameru (Wojtyra et al. 2003; Thibault et al. 2006; Glynn et al. 2009).

Krystalické struktury hexamerického prstence ClpX^{ΔN} odhalily, že AAA+ podjednotky se mohou vyskytovat ve dvou různých konformačních formách L (vazebné) a U (nevazebné). Ve

většině krystalických struktur je hexamer ClpX^{ΔN} tvořen čtyřmi podjednotkami L, které mohou vázat nukleotid, a dvěma U podjednotkami, které naopak vázat nukleotid nedokážou. Vznik vazebného místa závisí na vzájemné orientaci velkých a malých AAA+ domén. Nevazebné (U) podjednotky mají toto aktivní místo nefunkční, vlivem rotace pantové domény, která způsobí změnu orientace velké a malé AAA+ domény (Glynn et al. 2012; Stinson et al. 2013).

U většiny pozorovaných krystalických struktur ClpX jsou L a U podjednotky uspořádány v tomto motivu L/U/L/L/U/L, jdoucím proti směru hodinových ručiček (Obrázek 3). Obecně platí, že velká doména jedné podjednotky, se skládá naproti malé doméně proti směru hodinových ručiček sousedící podjednotky. Takovéto spojení domén sousedících podjednotek formuje velice rigidní strukturu. Z tohoto důvodu se na prstenec ClpX může nahlížet, jako na šestijednotkový rigidní komplex, kde každá jednotka je spojena flexibilním spojem (Obrázek 3) (Glynn et al. 2012; Stinson et al. 2013).



Obrázek 3: Struktura ClpX: (A) Vazba nukleotidu mezi velkou a malou AAA+ doménou podjednotky ClpX a kontakt velké domény B sousedící s malou doménou A po směru hodinových ručiček. (B) Pohled shora na ClpX, barevně jsou zde odlišeny L a U podjednotky. (C) Pohled shora na ClpX, kde jsou barevně od sebe odlišeny rigidní struktury. (D) Ve většině krystalových struktur se ClpX prstenec skládá ze čtyř L podjednotek, která váží nukleotid a dvou U podjednotek, které ho nemohou vázat. Vazebná místa jsou vyznačena červenou elipsou. Prstenec se skládá z šesti rigidních jednotek. Změny v konformacích flexibilních spojů, které propojují sousedící domény každé podjednotky, jsou zodpovědné za konformační změny v celém prstenci. (E) Blízký pohled na nukleotid vazebné místo a flexibilní spoj mezi dvěma doménami. – (upraveno Baker a Sauer 2012; Stinson et al. 2013)

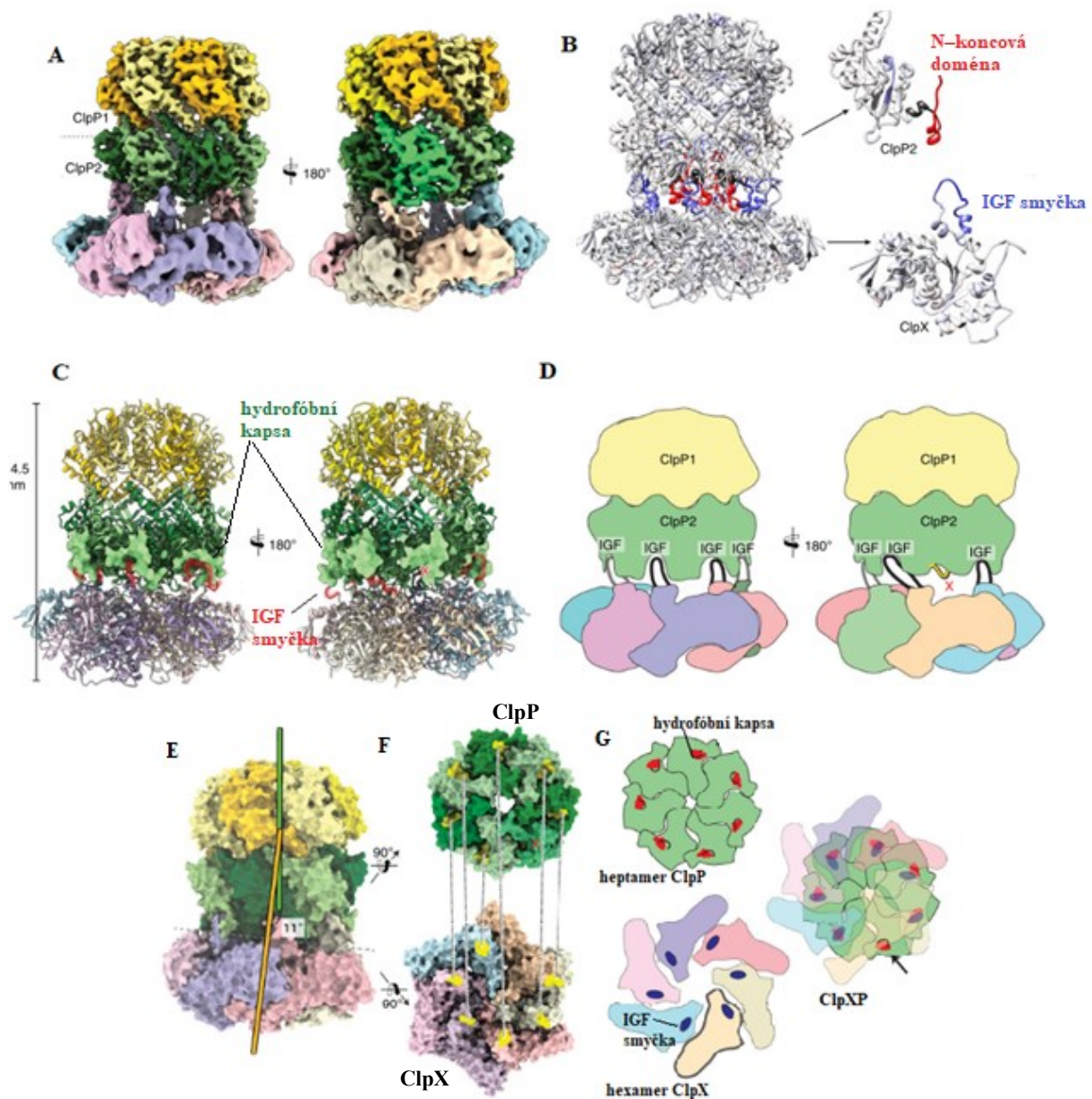
3.1.3 Interakce mezi ClpX a ClpP potřebné pro zformování proteolytického komplexu ClpXP

Snímky z elektronového mikroskopu (EM) s nízkým rozlišením ukázaly, že u ClpXP komplexu z *Escherichia coli* se až dva hexamerické ClpX šaperony mohou vázat na ClpP tetradekamerický barel. Proteolytický komplex ClpXP není strukturně zcela symetrickým objektem (*Obrázek 4*) (Beuron et al. 1998; Grimaud et al. 1998).

Byly popsány dva sekvenční motivy, pomocí kterých spolu tyto dva proteiny interagují. Porovnání aminokyselinových sekvencí AAA+ šaperonů, interagujících s ClpP, s AAA+ šaperony, které s ClpP neinteragují, odhalilo konzervovaný sekvenční motiv IGF (Kim et al. 2001). Tento sekvenční motiv vytváří smyčky, pomocí kterých ClpX interaguje s ClpP a bez jejichž přítomnosti nedojde ke složení komplexu (*Obrázek 4*). Mutace IGF smyček mají za následek oslabení, či ztrátu vazebných schopností, ale nemají vliv na ostatní funkce ClpX (Kim et al. 2001; Joshi et al. 2004; Martin et al. 2007).

Nedávno provedené studie s cyklickým acyldepsipeptidem (ADEP), novou třídou antimikrobiálních (ATM) látek, ukázaly, že ADEP se váže místo IGF motivů do hydrofobních kapes ClpP. Vazba ADEP způsobí otevření axiálního póru a stabilizaci otevřené aktivované formy ClpP (Brötz-Oesterhelt et al. 2005; Kirstein et al. 2009; Gersch et al. 2015; Gatsogiannis et al. 2019). ClpP v takovéto aktivované formě je schopné degradace proteinových substrátů. Nicméně, bez přítomnosti šaperonu ClpX, dochází k nespecifickým degradacím proteinů, což vede nakonec až k buněčné smrti. Ačkoliv ClpX interaguje s ClpP prostřednictvím IGF smyček se stejným vazebným místem jako ADEP, nezpůsobuje otevření axiálního póru (Alexopoulos et al. 2013; Gatsogiannis et al. 2019).

Druhá interakce nezbytná pro zformování komplexu ClpXP je kontakt N-koncové domény axiálního póru ClpP s druhou smyčkou póru ClpX (pór-2 smyčka) (*Obrázek 4*). Tato interakce je velice dynamická a závisí na nukleotidovém stavu ClpX (Martin et al. 2007).

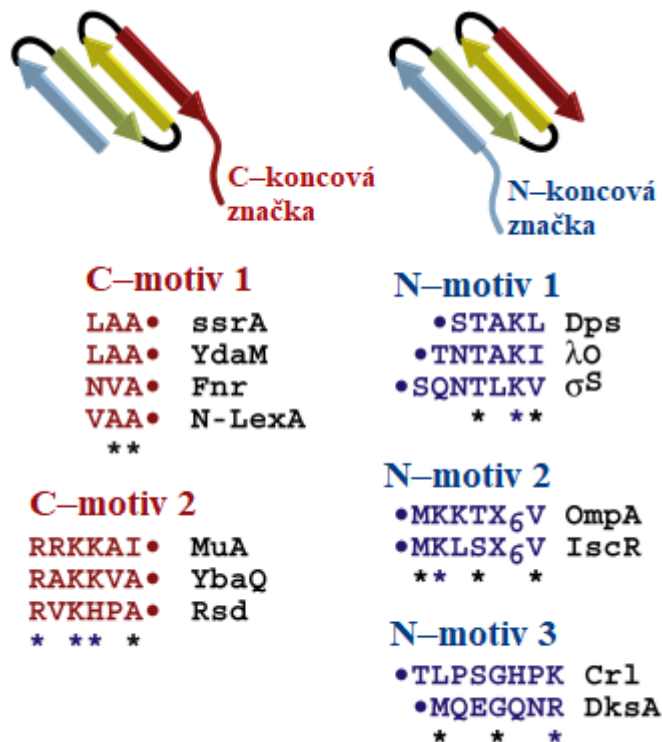


Obrázek 4 : Cryo-EM struktura proteolytického komplexu ClpXP (A) Cryo-EM mapa elektronové hustoty ClpXP pohled ze strany. (B) Proteolytický komplex ClpXP s vyznačenými interakčními motivy, modře IGF smyčky proteinu ClpX, červeně N-koncová doména ClpP. (C) Molekulární model ClpXP: Hydrofóbní kapsy ClpP2, které se tvoří mezi dvěma podjednotkami ClpP2, mají zvýrazněný povrch. IGF smyčky jsou značeny červeně. (D) Zjednodušená struktura ClpXP popisující hlavní interakce mezi hexamer ClpX a heptamerem ClpP2. (E–G) Asymetrie mezi hexamerem ClpX a heptamerem ClpP: (E) ClpX nasedá na ClpP s 11° náklonem od centrální roviny (F) Heptamer ClpP (zelená) se zvýrazněnými hydrofóbními kapsami a hexamer ClpX (pohledu ze spodu) se zvýrazněnými IGF smyčkami. IGF smyčky a hydrofóbní kapsy jsou spojeny přerušovanou čarou, červený křížek na ClpP označuje hydrofóbní kapsu, se kterou žádná IGF smyčka neinteraguje a vyskytuje se zde jen její vyčnívající C–konec. (G) Schématický model vazebných interakcí mezi ClpX a ClpP. Na levé straně jsou zobrazeny podjednotky ClpX a ClpP před sestavením proteolytického komplexu ClpXP a jsou u nich zvýrazněny interakční motivy (hydrofóbní kapsy a IGF smyčky). Na pravé straně je znázorněna interakce podjednotek po zformování komplexu. Zbývající volný hydrofóbní zlábk je označen šipkou. – (upraveno Gatsogiannis et al. 2019)

3.2 Mechanismus působení ClpXP a jeho role při kontrole hladiny proteinů v buňce

3.2.1 Rozpoznání substrátu

ClpX rozpoznává proteinové substráty vazbou na krátké nestrukturované peptidové sekvence, které se nazývají degradační značky či degrony. Degrony jsou přítomny buď na N–koncích nebo na C–koncích substrátů. Pokud jsou tyto značky přeneseny na nějaké proteiny, jsou odsouzeny k degradaci ClpXP komplexem (Baker a Sauer 2012). Bioinformatická analýza sekvencí proteinů, které byly purifikovány z proteolytických komor neaktivního ClpXP komplexu, odhalila pět tříd degradačních značek (Obrázek 5). Dvě jsou lokalizované na C–konci a tři na N–konci proteinu (Flynn et al. 2003). Dvě třídy C–koncových signálů sdílejí homologii se sekvencemi *ssrA* značky a MuA značky. Jedna třída N–koncových degronů je podobná sekvenci $\lambda 0$ proteinu pro ClpXP degradaci, zatímco jiná N–koncová třída zahrnuje signální sekvenci proteinu OmpA pro sekreci proteinů (Flynn et al. 2003). OmpA za normálních podmínek není lokalizován v cytosolu, ale je lokalizován ve vnější membráně. Z toho vyplývá, že ClpXP degradace cytoplasmatického OmpA by mohla hrát roli při kontrole kvality proteinu (Flynn et al. 2003).



Obrázek 5: Sekvence C–koncových a N–koncových značek, které jsou rozeznávány ClpX a odsouzeny k degradaci ClpXP komplexem. Červené tečky označují α –karboxylovou skupinu. Modré tečky označují α –amino skupinu proteinu. – (upraveno Baker a Sauer 2012)

Nejlépe prostudovaným příkladem rozpoznání specifického substrátu je interakce ClpX s degronem *ssrA* (Gur et al. 2011). Značka *ssrA* je u *Escherichia coli* C–koncový sekvenční motiv dlouhý jedenáct aminokyselin (Gottesman et al. 1998). Když se ribozom zastaví během proteosyntézy, *ssrA* značka je přidána na jeho nekompletní nascentní protein pomocí tmRNA (transfer messenger RNA) systému, čímž se zajistí degradace těchto polypeptidů (Lies a Maurizi 2008). Hlavními rozpoznávacími signály *ssrA* značky jsou dva C–koncové alaniny a negativně nabitá α –karboxylová skupina (AA-COOH). Zbylá část *ssrA* značky zprostředkovává vazbu se SspB adaptérem, který pomáhá při dopravě *ssrA* značeného proteinu do ClpXP komplexu a zvyšuje tím rychlost jeho degradace (Kim et al. 2000; Flynn et al. 2001; Lies a Maurizi 2008).

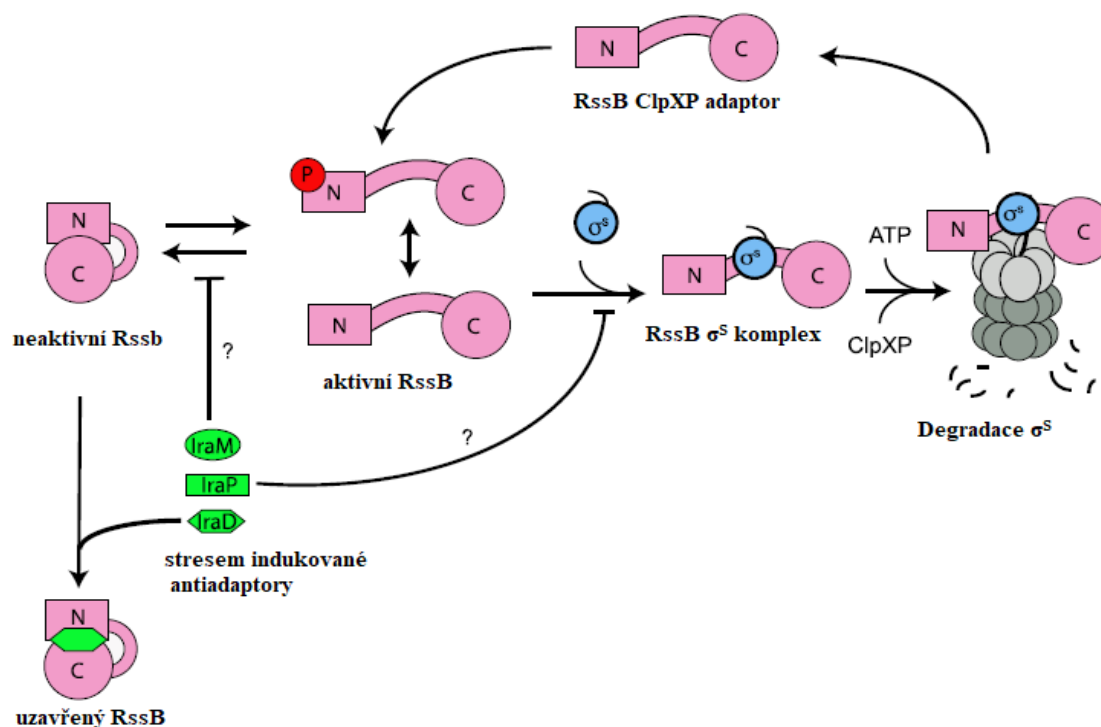
ClpX rozeznává *ssrA* značku prostřednictvím třech sad flexibilních smyček, které jsou umístěny v různých pozicích podél axiálního póru. Jedná se o RKH smyčky, které ohraničují vstup do póru ClpX, a dvě pórové smyčky (GYVG a pór–2 smyčky) (Siddiqui et al. 2004; Martin et al. 2007). Mutace RKH smyček výrazně snižují specifitu vazby *ssrA* značky, což ukazuje, že tyto smyčky působí jako selekční brána pro vstup do póru ClpX. Mutace pórových smyček zvyšují K_M (Michaelisova konstanta) a snižují afinitu ClpX k *ssrA* značeným substrátům (Martin et al. 2007). Kromě toho bodové mutace RKH smyček snižující jejich kladný náboj, snižují schopnost vázat negativně nabitou alfa karboxyly *ssrA* značky a zároveň zvyšují schopnost vázat substráty s kladně nabitou degradační značkou. Mezi tyto kladně nabitou značku patří například N–koncová $\lambda 0$ a C–koncová MuA značka. Tyto výsledky naznačují, že substrátová specifita ClpX je evolučním kompromisem, kterých dovoluje rozpoznání několika různých typů substrátů (Farrell et al. 2007).

3.2.2 Adaptory zprostředkovaná degradace substrátu

Dva adaptorové proteiny, SspB a RssB, spolupracují s ClpXP v regulaci proteolýzy specifických substrátů (Baker a Sauer 2012). RssB je dvou komponentový regulátor, který má za úkol dopravit σ^S faktor, podjednotku specifického promotoru stacionární fáze, do ClpXP, aby došlo k jeho degradaci během aktivního růstu (Dorich et al. 2019). Tato adaptorem zprostředkovaná specifická degradace σ^S je hlavním bodem pro regulaci a transkripční přeprogramování během obecné stresové reakce. RssB i σ^S faktor se váží na ClpX s malou afinitou. Tyto slabé vazebné interakce jsou stabilizovány po zformování ternárního komplexu RssB· σ^S ·ClpX (Zhou et al. 2001; Dorich et al. 2019).

Bylo navrženo, že RssB může jako substrát aktivující adaptor způsobit konformační změny σ^S faktoru a odhalit místa pro vazbu na ClpXP. RssB funguje pouze jako katalyzátor degradace

σ^S faktoru a není s ním společně degradován, ale je recyklován (Obrázek 6) (Klauck et al. 2001). RssB je atypickým regulátorem stresové odpovědi, protože jako jediný známý ClpXP adaptér je inhibován několika odlišnými antiadaptory (IraD, IraP a IraM). Tyto antiadaptory jsou indukovány rozdílnými stresovými signály a v reakci na ně se váží na RssB, čímž blokují degradaci σ^S faktoru (Obrázek 6). Způsoby, jakým se specifický antiadaptor váže na RssB nejsou zcela známy (Battesti et al. 2013; Dorich et al. 2019).

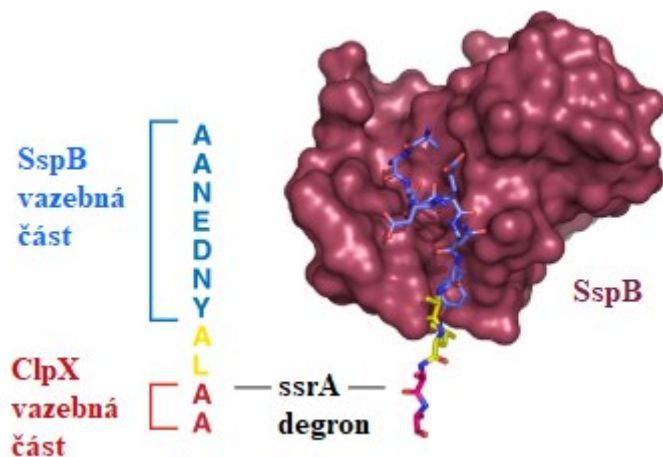


Obrázek 6 : Degradční dráha σ^S faktoru v *Escherichia coli*: Během aktivního růstu je σ^S faktor (modrá) pomocí RssB adaptoru (růžová) doveden do ClpXP (šedá) k rychlé degradaci. Vystavení buňky stresovým faktorům indukuje produkci antiadaptorních proteinů (IraP, IraM a IraD (zelená)), které inhibují RssB a zablokují σ^S degradaci. Fosforylace RssB (červená) zvyšuje afinitu RssB vázat σ^S , ale není nutný pro regulaci σ^S degradace. (Battesti et al. 2013). – (upraveno Dorich et al. 2019)

SspB napomáhá dopravovat ssaA značené substráty k ClpXP degradaci, ale také zvyšuje rychlost rozeznání a degradace ssaA značených a dalších jinak značených substrátů (Levchenko et al. 2000). Z předchozí kapitoly je zřejmé, že SspB není nezbytné pro vazbu ssaA značených substrátů k ClpXP degradaci, pouze jen zvyšuje afinitu a kooperaci vazby ssaA značených substrátů na ClpX (Wah et al. 2002).

SspB tvoří homodimerní strukturu, kde obě podjednotky v N–koncové oblasti obsahují dobře definované žlábkové, pomocí kterých váží N–koncovou a centrální část ssaA značky. Důležité je, aby C–koncová část ssaA značky zůstala odhalena pro přesné rozpoznání proteinem ClpX (Obrázek 7). Obě podjednotky SspB mají také vysoce konzervovanou flexibilní C–koncovou část, která interaguje specificky s N–koncovou ZBD doménou ClpX (Wojtyra et

al. 2003; Wah et al. 2003; Levchenko et al. 2003). Jednobodové mutace v C–koncové části SspB adaptoru jsou zcela dostatečné na to, aby došlo k přerušení SspB zprostředkované degradace ssrA značeného proteinu (Dougan et al. 2003). Stejně tak odstranění či mutace N–koncové části ClpX vede k přerušení SspB zprostředkované degradace ssrA značeného proteinu. Z toho vyplývá, že oba konce podjednotek SspB jsou potřebné pro vysoko–afinitní vazbu ssrA značeného proteinu k ClpX a pro efektivní stimulaci ClpXP degradace (Wojtyra et al. 2003).



Obrázek 7: Znázornění vazby ssrA značky se SspB adaptorem. Modře značená část ssrA sekvence, která se váže do žlábků N–koncové části podjednotky SspB. Červeně značené poslední dva C–koncové alaniny s α –karboxylovou skupinou pomocí, které zprostředkovávají interakci s ClpX – (upraveno Baker a Sauer 2012)

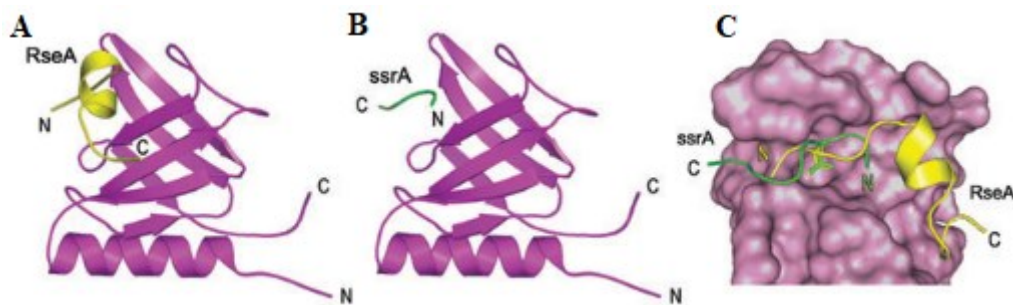
Pro sestavení stabilního doručovacího komplexu SspB–substrát(ssrA)–ClpX je zapotřebí slabých vazebních interakcí jak mezi N–koncovou ZBD ClpX a C–koncovou částí SspB, tak mezi ClpX a ssrA. Z toho vyplývá, že substrát značený ssrA musí být vázán na SspB ve stejnou dobu, jako musí být zapojený do ClpX pro zformování stabilního komplexu (Bolon et al. 2004b; 2004a).

Zvláštní je, že když se uměle vytvořila vazba mezi GFP (zelený fluorescenční protein) značeným ssrA a adaptérem SspB, tak proteáza ClpXP degradovala jak GFP, tak kovalentně navázaný adaptor. Možný mechanismus tohoto jevu je, že ClpX táhne značku ssrA, čímž zahajuje degradaci a tím současně přerušuje slabé kontakty se SspB (Bolon et al. 2004b).

Kromě zvýšení schopnosti degradovat ssrA značené substráty, SspB také pomáhá degradaci N–koncového fragmentu transmembránového RseA proteinu stresové reakce (N–RseA) (Flynn et al. 2004). Za běžných podmínek se RseA váže na transkripční faktor σ^E , čímž mu zabraňuje v aktivaci transkripce. Při poškození buněčné stěny dojde k aktivaci ESR (reakce na stresový faktor buněčného obalu) regulační odpovědi, při které je RseA štěpen membránovou proteázou

za uvolnění N–RseA v komplexu se σ^E do cytosolu. SspB poté dopraví N–RseA do ClpXP, která degraduje N–RseA a uvolní σ^E pro aktivaci transkripce stresových genů (Levchenko et al. 2005).

N–RseA je rozpoznáván proteinem ClpX podobným způsobem, jako je rozpoznávána ssrA značka viz. kapitola 3.2.1. Překvapivé je, že není známa žádná sekvenční podobnost mezi oblastí N–RseA, která interaguje se SspB a oblastí ssrA značky, která se SspB rovněž interaguje. Navíc, oblast N–RseA, která váže SspB interaguje s peptidickým žlábkem v opačné orientaci než ssrA značka (Obrázek 8) (Levchenko et al. 2005).



Obrázek 8: Struktura RseA a ssrA peptidů vázajících se na adaptor SspB. (A) Zobrazení jedné podjednotky SspB (fialová) vázající RseA (žlutá). (B) Zobrazení jedné podjednotky SspB vázající ssrA peptid (zelená). (C) Povrchové znázornění opačné orientace vazby ssrA peptidu a RseA peptidu ve žlábků SspB. – (upraveno Levchenko et al. 2005)

3.2.3 tmRNA systém

K zastavení translace na ribozomu může v buňce dojít různými způsoby, někdy k němu dochází cíleně, například působením antibiotik inhibujících translaci (erythromycin), a jindy k němu dochází zcela náhodně, například když translatovaná mRNA postrádá stop kodon (Himeno et al. 2014). Z těchto důvodů potřebuje mít buňka systém, který by dokázal zastavené ribozomální komplexy recyklovat pro další kola translace. Bez přítomnosti záchranného systému by se v buňce začaly tyto zastavené ribozomální komplexy hromadit, což by nakonec vedlo až k buněčné smrti. Jedním z dobře popsanych systémů záchrany zastavených ribozomů je tmRNA systém (Chadani et al. 2010; 2011).

TmRNA je malá molekula RNA, která sdílí mnoho strukturních a funkčních podobností společně s molekulou tRNA. Její 5' a 3' konce formují strukturu podobnou akceptorovému ramenu a T ramenu tRNA (Ushida et al. 1994; Komine et al. 1994). Funkčními podobnostmi tmRNA a tRNA jsou, že 3' konec tmRNA může být nabitý aminokyselinou (alaninem) pomocí aminoacyl–tRNA syntetázy (Ushida et al. 1994; Komine et al. 1994), 5'konec je zpracován RNAzou P (Komine et al. 1994), dále má schopnost vázat se s elongačním faktorem Tu (EF–

Tu) po aminoacylační reakci (Rudinger-Thirion et al. 1999), a nakonec dokáže interagovat se 70S ribozomem (Ushida et al. 1994).

Na rozdíl od tRNA tmRNA neobsahuje žádnou antikodonovou část, ale obsahuje krátkou peptid kódující sekvenci nacházející se v MLD (mRNA podobné doméně) doméně tmRNA molekuly. Tato sekvence kóduje krátký polypeptidový řetězec, který je sekvenčně podobný ssrA proteinové značce s koncovou stop kodonovou sekvencí, tudíž se tmRNA zároveň chová i jako mRNA (Tu et al. 1995). Výsledkem působení tmRNA záchranného systému je volný nascentní polypeptid, který na svém C–konci nese sekvenci kódovanou tmRNA (Keiler et al. 1996).

Správná funkce tmRNA vyžaduje tři proteiny: aminoacyl–tRNA syntetázu (Komine et al. 1994), EF–Tu (Rudinger-Thirion et al. 1999) a malý protein B (SmpB) (Karzai et al. 1999). SmpB se váže na molekulu tmRNA přes její T rameno a společně s ním napodobují tRNA. Nejdříve je tmRNA s navázaným SmpB aminoacylována aminoacyl–tRNA syntetázou (Karzai et al. 1999). Tento nabitý komplex (Ala–tmRNA) se váže s EF–Tu·GTP, který ho přivádí do A–místa ribozomu. Hydrolyza GTP a následné uvolnění EF–Tu·GDP vede ke konformačním změnám, díky kterým může dojít k umístění Ala–tmRNA do A–místa. Poté je nascentní polypeptid přenesen na Ala–tmRNA peptidyltransferázovou reakcí. Během tohoto procesu interaguje C–konec SmpB se vstupním kanálem pro mRNA a za přítomnosti elongačního faktoru G je následně celý komplex přemístěn do P–místa mechanismem podobným běžné translaci (Ramrath et al. 2012; Rae et al. 2019).

V dalším kroku se uvolní původní mRNA z ribozomu a dojde k obnově translace otevřeného čtecího rámce MLD tmRNA. Translací MLD domény dojde k prodloužení nascentního polypeptidu o ssrA degradační sekvenci, následovanou stop kodonem, který umožní terminaci translace. V důsledku toho je polypeptid uvolněn z ribozomu se ssrA degronem na C-konci. Jelikož je tato značka účinně rozpoznávána ClpX, jsou produkty trans–translace rychle degradovány (Rae et al. 2019).

3.2.4 Rozbalení a translokace substrátu určeného k degradaci pomocí ClpXP

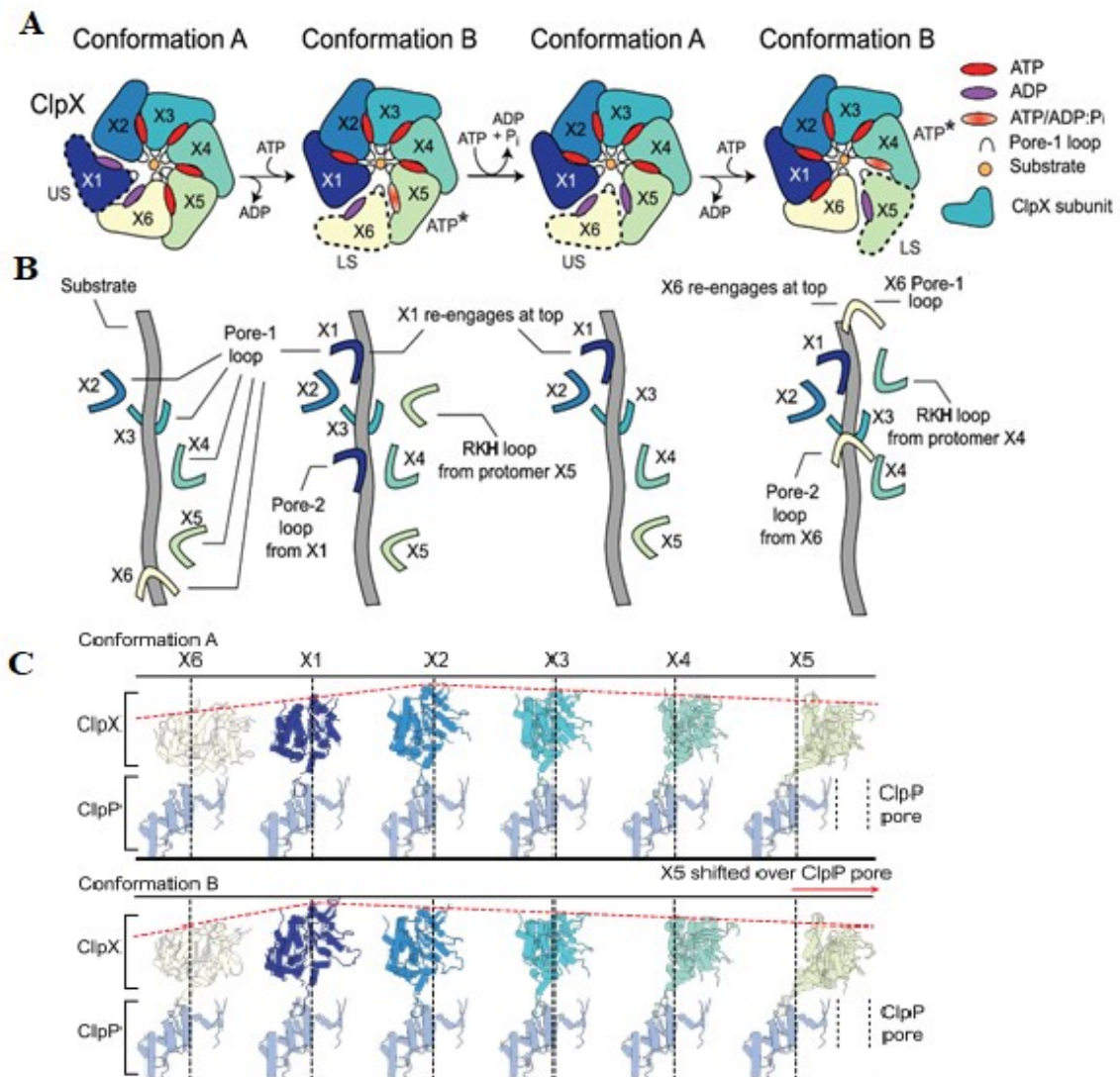
Po rozpoznání a navázání proteinu určeného k degradaci na ClpX, nastanou konformační změny v AAA+ prstenci, pomocí nichž se začne posouvat degradační značka skrz pór. Tyto konformační změny jsou poháněny vazebnými a hydrolytickými cykly ATP (Martin et al. 2008). Jakmile nativní část proteinu dosáhne axiálního póru, který je příliš úzký na to, aby umožnil jeho průchod, dojde k několika cyklům hydrolyzy ATP a k přidruženým energetickým tahům. Výsledkem těchto událostí je tažná síla působící na strukturu proteinu, která může

vyústit k jeho denaturaci. Rozbalený polypeptid je následně translokován axiálním pórem až do proteolytické komory, kde je štěpen na peptidové fragmenty (Baker a Sauer 2012).

Aktivita vedoucí k rozbalení proteinu z nativního stavu závisí na řadě konzervovaných smyček ClpX. Mezi tyto smyčky patří RHK smyčky a pórové smyčky (GYVG a pór-2) (Martin et al. 2008). Tyto smyčky obsahují objemné aromatické a alifatické postranní řetězce pomocí nichž se přenáší tažná síla na substrát, která vede k jeho rozbalení (Ripstein et al. 2017; Fei et al. 2020).

Z nedávno provedené studie zabývající se tím, jak sekvence translokovaného substrátu ovlivňuje míru schopnosti ClpX substrát uchopit, vyšlo najevo, že velké hydrofobní a aromatické postranní řetězce jsou uchopeny silněji než malé polární nebo nabitě postranní řetězce a hlavně, že přilnavost k substrátu je primárně zprostředkována nespécifickými van der Waalsovými interakcemi mezi postranními řetězci substrátu a podmnožinou GYVG smyček v axiálním póru ClpX (Bell et al. 2019).

Byla navržena řada modelů, vycházejících ze strukturních analýz AAA+ ATPáz, popisující mechanickou práci protomerů ClpX během translokace substrátu. V nejnovějších studiích převažuje rotační model cyklické hydrolýzy podporující model „hand-over-hand“ mechanismu translokace (Shin et al. 2019; Ripstein et al. 2020). Model „hand-over-hand“ translokačního mechanismu spočívá v tom, že ATP je postupně hydrolyzováno z jedné podjednotky na druhou a dané podjednotky postupně migrují ze spodní do vrchní pozice spirály a zase zpět (Enemark a Joshua-Tor 2006). Ze studie cryo-EM struktury ClpXP komplexu z *Neisseria meningitis*, lze vysvětlit translokační mechanismus pomocí dvou konformací, konformace A a konformace B, které představují kroky substrát translokační dráhy, kde každý z protomerů ClpX (X1–X6), bude rotovat mezi všemi šesti pozicemi podél spirály. Tento cyklus je spojen s hydrolýzou ATP, s pozicí pórových smyček ClpX podél substrátu a s interakcí IGF smyček s ClpP (Ripstein et al. 2020). Translokační mechanismus popisuje (Obrázek 9).



Obrázek 9: Translokační model ClpXP. (A) Schéma ClpX–nukleotid–dependentního konformačního cyklu. Začátek translokačního cyklu bude popsán na X1 protomeru v konformaci A v horní (US) pozici vzhledem k ClpP (9A první kruh). Přechod z konformace A do konformace B je zprostředkován výměnou nukleotidů na protomeru X1 v US pozici (9A první a druhý kruh) přičemž hydrolyza ATP a uvolnění fosfátu ze stavu připraveného k hydrolyze ATP (ATP*) obnoví zpět konformaci A (9A druhý a třetí kruh). Změna konformace (A→B) vede k zapojení pórových smyček protomeru X1 se substrátem, což vede k jeho následnému posunu do proteolytické komory. Rovněž během této změny konformace dochází k uvolnění pórových smyček protomeru X6 od substrátu a také protomer X6 zaujme spodní pozici (LS) vzhledem k ClpP. Hydrolyzou ATP* (přechod z B→A) se protomer X6 dostává do US pozice a cyklus se může opakovat. Komplex je tedy resetován do stavu, kdy může provádět další krok translokace přechodem z konformace A na konformaci B jen nyní se bude protomer X6 chovat jako protomer X1 v předchozím kroku (Ripstein et al. 2020). (B) „Hand-over-hand“ mechanismus translokace zprostředkované pórovými smyčkami. První přechod z konformace A na konformaci B. Při první přechodu z konformace A do konformace B se X1 z US pozice dostává na horní část spirály a X6 se otáčí od centrálního póru, aby zaujala LS pozici. Opakováním těchto pohybů se pórové smyčky pohybují nahoru po substrátu a táhnou ho dolů do proteolytické komory ClpP. (C) Pozice protomerů ClpX vzhledem k ClpP při přechodu z konformace A do konformace B. V obou konformacích je ClpX ve spirálovém uspořádání vzhledem k ClpP (červená tečkovaná čára). V konformaci A je protomer X2 umístěn v horní části spirály, zatímco v konformaci B zaujímá protomer X1 horní polohu asi o 7 Å vyšší, než je jeho pozice v konformaci. – (upraveno Ripstein et al. 2020)

4 Vliv ClpX a ClpP na fyziologii a virulenci u *Staphylococcus aureus*

4.1 Vliv ClpXP a ClpX na virulenci u *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je jedním z hlavních lidských patogenů, který způsobuje široké spektrum infekcí od povrchových infekcí ran či po život ohrožující systémové infekce (Frees et al. 2003). Zásadní pro patogenitu *S. aureus* je řada proteinů asociovaných s buněčným povrchem a velké množství vylučovaných proteinů. Tyto proteiny jsou produkovány koordinovaně v závislosti na růstové fázi. Proteiny buněčného povrchu (protein A a proteiny vázající fibrinogen, fibronektin a kolagen) jsou produkovány hlavně na počátku infekce (resp. během exponenciální fázi růstu), jelikož umožňují bakteriím kolonizovat hostitele a vytvořit ohnisko infekce (Frees et al. 2003). Mezi vylučované proteiny patří toxiny a enzymy degradující tkáň (hemolyziny, proteázy, lipázy, koagulázy a enterotoxiny), které se převážně produkují v pozdějších fázích infekce (resp. při přechodu do stacionární fáze růstu) (Frees et al. 2003).

Jedním ze základních řídicích prvků této koordinované regulace virulentních genů je komplexní quorum-sensing regulační systém doplňkových genů (*agr*), reagující na koncentraci vylučovaných autoindukujících peptidů (AIP). To umožňuje vnímat vlastní hustotu populace. Kromě *agr* systému využívá *S. aureus* k detekci specifických podnětů z prostředí další dvoukomponentové systémy, a koordinuje odpovědi s cytoplazmatickými regulátory rodiny proteinů Sar a alternativními σ faktory (Jenul a Horswill 2019).

Agr lokus se skládá ze dvou rozdílných regulačních nekódujících transkriptů RNAII a RNAIII, které jsou pod kontrolou promotorů P2 a P3. RNAII kóduje AIP a dvoukomponentový signální systém, který reaguje na extracelulární koncentraci AIP. Indukce tímto quorum – sensing mechanismem vede k produkci RNAIII transkriptu, který je efektoem produkce virulentních genů (Jenul a Horswill 2019). Pro maximální expresi RNAIII je nutný globální regulátor, DNA vazebný transkripční regulátor SarA. SarA nezávisle na *agr* reguluje transkripci vybraných cílových genů mechanismem, který zahrnuje přímé navázání SarA na promotorovou oblast. (Frees et al. 2005; Jenul a Horswill 2019).

Bylo pozorováno, že produkce některých extracelulárních virulentních faktorů (například alfa-hemolyzinu) byla snížena u mutant postrádající ClpXP proteázu. To mělo za následek snížení virulence daných mutantních kmenů (Frees et al. 2003). Nepřítomnost ClpXP snižovala jak transkripci *agr* efektorové molekuly RNAIII, tak produkci AIP. Toto zjištění vedlo k závěru, že ClpXP reguluje syntézu virulentních genů prostřednictvím *agr* systému (Frees et

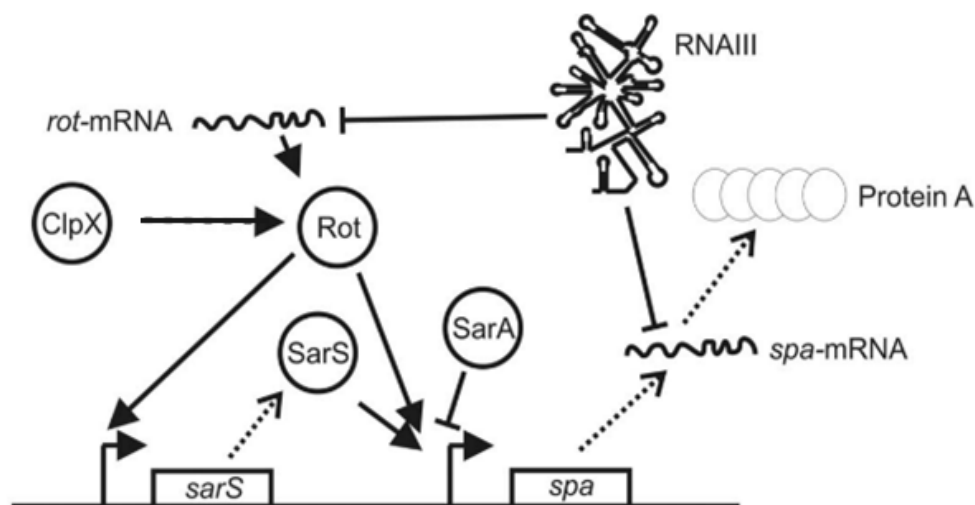
al. 2003; 2005). Dále bylo pozorováno, že ClpX je vyžadován pro transkripci genu *spa* (stafylokokový protein A) kódující protein A, který je součástí buněčné stěny (Frees et al. 2003). Produkce ostatních virulentních proteinů buněčné stěny (proteiny vázající fibrinogen, fibronektin a kolagen) není závislá na působení ClpX, jelikož mutanty s delecí *clpX* produkovaly zvýšená množství těchto proteinů (Frees et al. 2005).

4.1.1 Působení ClpX na produkci proteinu A

Protein A je hlavní povrchově vázaný virulentní faktor vyskytující se ve všech kmenech *S. aureus*. Váže Fc–oblast těžkého řetězce imunoglobulinů (zejména IgG) a von Willebrandův faktor, čímž vyvolá zánětlivé reakce u hostitele (Foster a McDevitt 1994; Jelsbak et al. 2010). Produkce proteinu A je regulována růstovou fází a je řízena komplexními regulačními sítěmi působícími na transkripční, translační a posttranslační úrovni. Na vrcholu této regulační sítě je *agr* quorum – sensing systém viz. kapitola 4.1 (Jelsbak et al. 2010).

RNAIII molekula snižuje produkci proteinu A přímým i nepřímým působením. Přímým působením RNAIII molekul je jejich vazba na *spa* mRNA molekuly. Tato vazba snižuje syntézu proteinu A na dvou úrovních. Jednak inhibuje translaci *spa* mRNA a zároveň podporuje jeho degradaci (Huntzinger et al. 2005; Jelsbak et al. 2010). Nepřímo RNAIII snižuje transkripci *spa* inhibicí translace *rot* mRNA. Rot protein, patřící do rodiny Sar proteinů, stimuluje transkripci *spa* dvěma způsoby: přímou vazbou na *spa* promotor, anebo nepřímo zvýšením transkripční úrovně *sarS*. Podobně jako Rot aktivuje SarS transkripci *spa* prostřednictvím přímých interakcí s oblastí *spa* promotoru. Aktivační aktivity Rot a SarS na expresi *spa* jsou potlačovány represorem SarA a σ^B faktorem během stacionární fáze růstu (Hsieh et al. 2008; Jelsbak et al. 2010). Model regulace naznačuje, že SarS a Rot působí společně jako pozitivní regulátory transkripce *spa*, zatímco SarA jako negativní regulátor soupeří s nimi o překrývající se vazebná operátorová místa na *spa* (Jelsbak et al. 2010). Přesná role σ^B není zcela objasněna, předpokládá

se, že σ^B ovlivňuje stabilitu *rot* mRNA a nebo má vliv na expresi transkripčních faktorů, které snižují expresi *rot* během stacionární fáze růstu (Hsieh et al. 2008).



Obrázek 10: Model zobrazující regulační síť kontrolující produkci proteinu A: Transkripce *spa* je pozitivně regulována transkripčními aktivátory Rot a SarS a negativně regulována SarA. Translace *spa* mRNA a *rot* mRNA je inhibována RNAIII. Na tomto modelu není vyznačena role σ^B faktoru.– (upraveno Jelsbak et al. 2010)

Studii mutantů *clpX* bylo zjištěno, že ClpX je nezbytný pro maximální produkci Rot proteinu, protože buňky bez ClpX obsahují přibližně 2–3krát méně Rot proteinu než buňky divokého typu. Dvojnásobné snížení produkce Rot způsobí 90% snížení celkové produkce proteinu A (Jelsbak et al. 2010). Takový pokles množství proteinu A naznačuje, že k jeho produkci je zapotřebí udržovat určitou prahovou koncentraci Rot. Tato prahová koncentrace je zapotřebí k tomu, aby došlo k zmírnění účinku negativních inhibitorů na expresi genu *spa* a zároveň její překročení by vedlo ke zvýšení exprese tohoto genu. Mutanty *clpX* nedosahují této prahové koncentrace Rot, vlivem přímého působení ClpX na jeho produkci, a tudíž mají defekty v produkci proteinu A (Jelsbak et al. 2010). Experimenty zaměřené na určení role ClpX v syntéze Rot odhalily, že ClpX má dvojí roli v regulaci produkce proteinu A. Zprvé stimuluje transkripci genu *spa* zvýšením translace Rot a zadruhé je vyžadován pro úplnou translaci *spa* mRNA (Jelsbak et al. 2010).

4.2 ClpX ovlivňuje buněčnou fyziologii a stresovou toleranci *S. aureus*

Během průběhu infekce jsou patogeny vystaveny různým stresovým faktorům: teplotním změnám, změnám pH, nutričnímu hladovění či vystavení reaktivním formám kyslíku, které produkují hostitelské fagocyty (Frees et al. 2003). Během teplotního stresu se většina proteinů rozbaluje ze své nativní konformace a tvoří shluky. Buněčnou odpovědí na toto chování je

syntéza šaperonů a proteáz. Proteázy mají za úkol odstranit vzniklé proteinové shluky a obnovit proteinovou homeostázu a buněčné šaperony se pokouší složit stresem poškozené proteiny do nativní konformace. Proteiny, které se nepodaří složit, jsou posléze degradovány (Frees et al. 2003; Stahlhut et al. 2017).

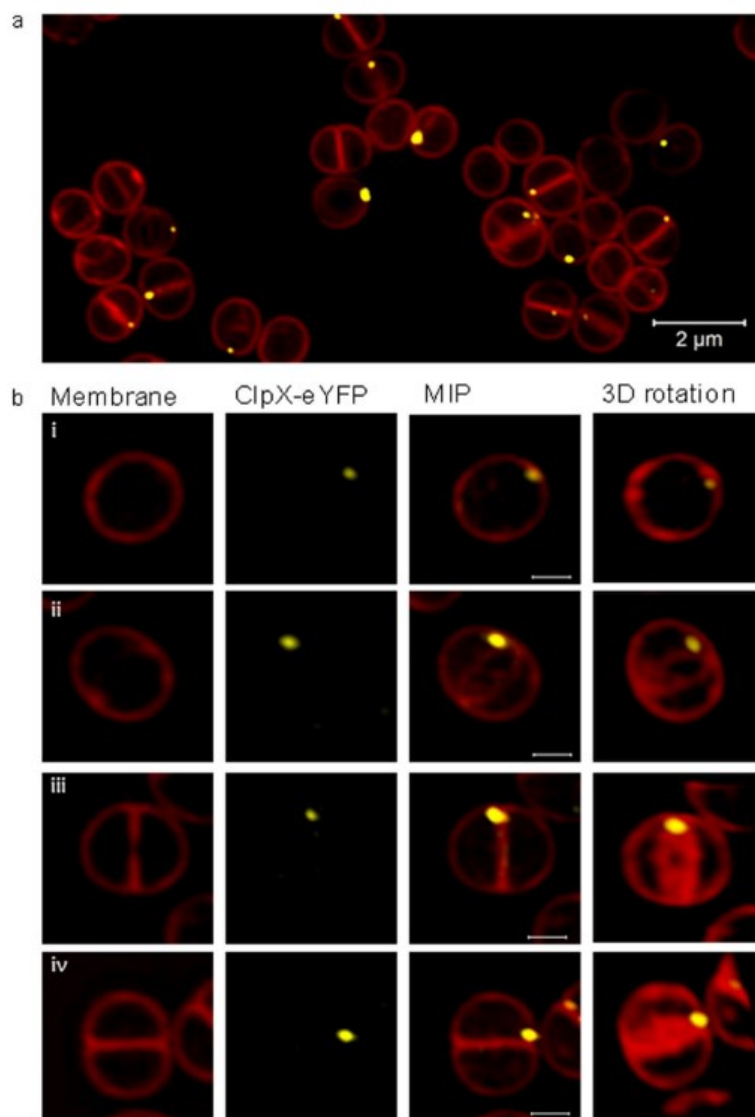
Bylo zjištěno že proteáza ClpP je nezbytná pro růst za stresových podmínek, při kterých vznikají špatně složené proteiny (Frees et al. 2003). Naproti tomu *clpX* mutanta rostla při vyšších teplotách a v přítomnosti vyšších koncentrací puromycinu než divoký typ (Frees et al. 2003; 2004). Během tepelného stresu využívá *S. aureus* z velké míry šaperon ClpC, který patří do rodiny AAA+ proteáz stejně jako ClpX. ClpC během teplotního stresu zprostředkovává skrz interakci s ClpP degradaci teplem denaturovaných proteinů (Frees et al. 2004; Stahlhut et al. 2017). To že *S. aureus* využívá z větší míry ClpCP k denaturaci špatně složených proteinů při tepelném stresu, nevylučuje, že ClpXP také přispívá k degradaci stresem poškozených proteinů. Avšak funkční ClpXP proteáza nestačí k zajištění růstu a přežití *S. aureus* v podmínkách vyvolávající masivní rozvinutí proteinů, jelikož inaktivace *clpC* vytváří mutantní fenotyp silně citlivý na teplo (Stahlhut et al. 2017).

Jelikož mutanty s inaktivním *clpX* zlepšují přežití *S. aureus* za vyšších teplot, je zřejmé, že ClpX se nechová jako klasický šaperon tepelného šoku. Zajímavé je, že tyto mutanty nedokázaly růst při teplotách nižších než 30 °C a zároveň vykazovaly mnohem menší velikost buněk v porovnání s divokým typem (Frees et al. 2004).

Pro nosokomiální patogeny např. *S. aureus* je vedle produkce virulentních faktorů důležitá i schopnost tvořit biofilm. Je zajímavé, že tvorba biofilmu byla snížena v nepřítomnosti ClpX anebo ClpC, zatímco v nepřítomnosti ClpP byla zvýšena. Molekulární mechanismus působení ClpC a ClpX na tvorbu biofilmu není znám a vyžaduje další výzkum (Frees et al. 2004).

4.3 ClpX jako faktor podílející se na tvorbě septa u *S. aureus* a jeho možný vliv na transkripci genů zodpovědných za buněčné dělení

Nezávisle na ClpXP ovlivňuje ClpX transkripci malého počtu genů, které mají roli v syntéze buněčné stěny a dělení buněk. Zajímavé je, že ClpX se vyskytuje v jednotlivých ložiscích v těsné blízkosti septa (Jensen et al. 2019b). U *Caulobacter* je subcelulární umístění ClpXP na pólu buněk důležité pro regulaci buněčného cyklu (Jenal a Fuchs 1998). Zjištění, že ClpX *S. aureus* je umístěno v odlišných ohniscích poblíž septa během dělení buněk (Obrázek 11), nahrává myšlence, že aktivita ClpX je omezena na jedno konkrétní subcelulární místo v procesu buněčného dělení *S. aureus* (Jensen et al. 2019b).

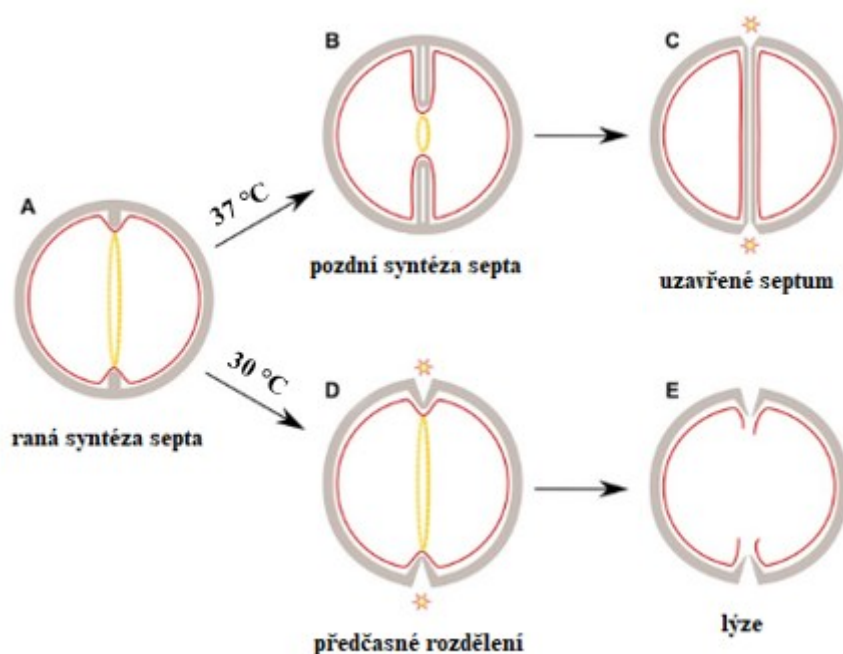


Obrázek 11: Snímky zobrazující umístění derivátu ClpX značeného žlutým fluorescenčním proteinem (ClpX–e YFP) v blízkosti septa při dělení buňky ve 37 °C pořízené za využití superrezoluční mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SR–SIM): (a) Fokální lokalizace ClpX–eYFP v blízkosti membrány buněk *S. aureus*. (b) Umístění ClpX–eYFP v buňkách *S. aureus* v různých stádiích buněčného dělení: (i) buňky, které ještě nezačaly tvořit septum, (ii–iii) buňky u kterých nedošlo ještě k uzavření septa a (iv) buňky s kompletně dokončeným septem. – (upraveno Jensen et al. 2019b)

Dále bylo zjištěno, že mutanty *clpX* mají odlišný způsob syntézy septa a dochází u nich k iniciaci separace dceřiných buněk ještě před dokončením septa. Tento efekt byl pozorován u mutantů rostoucích při 30 °C, ale již nebyl pozorován u mutantů rostoucích při 37 °C. Toto chování je důkazem, že ClpX se stává kritickým faktorem pro koordinaci buněčného cyklu *S. aureus* během poklesu teploty (Frees et al. 2004; Bæk et al. 2016; Jensen et al. 2019a). Tento na chlad citlivý růstový defekt *clpX* mutanty je nezávislý na činnosti ClpP a je zmírněn ztrátou funkce v genu *ltaS*. *LtaS* kóduje LtaS syntetázu, která je nezbytná pro syntézu lipoteichoové kyseliny (LTA). Tato kyselina je esenciálním polymerem buněčné stěny grampozitivních bakterií kontrolující buněčné dělení a autolytickou aktivitu (Bæk et al. 2016; Jensen et al. 2019a).

Předčasné rozdělení buněk je základní příčinou vysoké rychlosti spontánní lýze pozorované mezi *clpX* mutanty rostoucí při 30 °C (Bæk et al. 2016; Jensen et al. 2019a). Ikdyž tyto mutanty obsahují zvýšené koncentrace dvou hlavních autolysinů, není jejich zvýšená koncentrace hlavním důvodem předčasného rozdělení buněk. Není vyloučeno, že tyto autolysiny se nepodílí jistou měrou na tomto chování, avšak u mutantů rostoucí při teplotě 37 °C, u kterých je vyšší hladina autolysinů pozorovaná rovněž, nedochází k předčasnému rozdělení buněk (Bæk et al. 2016; Jensen et al. 2019a). Níže popsáný model (Obrázek 12) pravděpodobně vysvětluje tohoto rozdílně chování mutantu *clpX* při teplotách 30 °C a 37 °C. Tento model je založen na myšlence, že zastavení syntézy septa vystavuje buňky riziku předčasné aktivace autolysinů (Jensen et al. 2019a). Předpokladem pro fungování tohoto modelu je, že ClpX přímým či nepřímým způsobem podporuje přechod z rané do pozdní fáze syntézy septa při 30 °C. Prokázat tuto hypotézu bude však obtížné, jelikož molekulární šaperony, jako je ClpX, s meziprodukty substrátových proteinů interagují pouze přechodně během procesu skládání (Jensen et al. 2019a).

Zajímavé je, že defekty v růstu a lýzi způsobené delecí *clpX* byly sníženy u mutant vystaveným subletálními koncentracím β -laktamových antibiotik. (Jensen et al. 2019a). Bylo zjištěno, že β -laktamy zpožďují autolytické štěpení dceřiných buněk, a navíc prodlužují syntézu peptidoglykanu při dokončení tvorby septa. Toto zjištění podporuje myšlenku, že v *S. aureus* je účinek β -laktamových antibiotik spojen s koordinací buněčného dělení a tedy nezabíjí buňky pouze oslabením jejich buněčné stěny (Jensen et al. 2019a).



Obrázek 12: Model zobrazující lýzi *S. aureus clpX* mutanty v závislosti na teplotě růstu: Model předpokládá, že přechod z rané fáze do pozdní fáze tvorby septa je závislý na šaperonové aktivitě ClpX pouze při 30 °C a nikoliv při 37 °C. Mutanty *clpX* mají vyšší hladiny autolysinů, což je dělá náchylnější k iniciaci separace buněk před dokončením septa. Jelikož mutanty rostoucí při 30 °C vyžadují k přechodu z časné do pozdní fáze tvorby septa přítomnost ClpX (A–B), stává se, že vlivem jeho absence se syntéza septa občas zastaví v rané fázi syntézy. Zastavení syntézy septa vystaví buňku riziku štěpení obvodové stěny autolysinů (D). Buňky, které jsou předčasně štěpeny jsou náchylnější k lýzi, z důvodu toho že tlaková síla turgoru rozbije tenkou mechanicky slabou buněčnou stěnu na špičce dorůstajícího septa (E). Při 37 °C dochází k přechodu z rané fáze do pozdní fáze syntézy septa (A–B) v nepřítomnosti ClpX. Po uzavření septa dojde k uvolnění faktorů aktivujících autolytické štěpení dceřiných buněk (C). – (upraveno Jensen et.al 2019a)

5 Funkce ClpX nezávislá na ClpP u jiných bakterií

5.1 ClpX jako faktor virulence u *Bacillus anthracis* a *Streptococcus suis* sérotypu 2

Bacillus anthracis je grampozitivní sporulující bakterie a původce závažného až smrtelného onemocnění antrax. Antrax se projevuje v případě, když bakteriální endospory vstoupí do těla odřeninou v kůži, gastrointestinálním nebo dýchacím traktem. Vzhledem k relativní snadnosti šíření spor a schopnosti způsobovat smrtelné onemocnění je tento patogen považován za potenciální nástroj bioterorismu (Bouzianas 2009).

Podobně jako u *S. aureus* ovlivňuje ClpX a ClpP u *B. anthracis* řadu virulentních faktorů a jejich ztráta může zvýšit citlivost na stresové podmínky a snížit jeho virulenci. Ztráta *clpX* zvyšuje u tohoto patogena náchylnost k ATM látkám, které cílí na buněčnou membránu anebo na buněčnou stěnu a rovněž snižuje schopnost tvořit spory (McGillivray et al. 2009). Mezi tyto

ATM látky patří LL-37, který patří do skupiny katelicidinových ATM peptidů a antibiotika penicilin a daptomycin (Claunch et al. 2018a). Přesný molekulární mechanismus působení těchto látek na *B. anthracis* není zcela znám a pravděpodobně se bude jednat o podobný molekulární mechanismus, který je pozorován u *S. aureus* (Claunch et al. 2018b).

Streptococcus suis sérotyp 2 je jedním z dominantních patogenů způsobujících řadu onemocnění zahrnující otravu krve, meningitidu, endokarditidu a případně smrt u prasat či lidí. Jako u *B. anthracis* a *S. aureus* ClpX ovlivňuje řadu virulentních faktorů a citlivost na stresové podmínky. Zajímavé je však zjištění, že na rozdíl od *S. aureus* není pro tvorbu biofilmu nutná přítomnost ClpX, ale proteázy ClpP, která u *S. aureus* naopak způsobuje snížení tvorby biofilmu. Molekulární mechanismus tohoto jevu není znám. (Roy et al. 2019). Toto rozdílné chování ukazuje na to, že ClpX může mít různý vliv na fyziologii odlišných bakteriálních druhů, ikdyž se jedná o strukturně konzervovaný šaperon.

5.2 Vliv ClpX na tvorbu biofilmu, buněčnou adhezi, virulenci a stresovou toleranci u *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Xanthomonas campestris pv. *campestris* je bakteriální patogen způsobující onemocnění černé hniloby postihující především brukvovité rostliny. Jelikož mezi brukvovité rostliny patří řada zemědělsky významných plodin, jako je brokolice, kapusta, květák a zelí, může tento patogen způsobovat rozsáhlé ztráty na úrodě a kvalitě pěstovaných plodin (Vicente a Holub 2013; Lo et al. 2019).

Bylo prokázáno, že mutanty s delecí *clpX* mají sníženou produkci virulentních faktorů a adhezivních molekul, což vede i ke snížené schopnosti tvořit biofilm. Dále bylo pozorováno, že tyto mutanty mají zvýšenou citlivost na řadu stresových faktorů: teplo, puromycin a dodecylsírán sodný (SDS) (Lo et al. 2019). Tento mutantní fenotyp je zcela odlišný oproti pozorovanému mutantnímu fenotypu *S. aureus*. U *S. aureus* je inaktivace *clpX* spojena s vyšší odolností na vysokou teplotu i vyšší koncentraci puromycinu a naopak jeho přítomnost je klíčová pro růst za nízkých teplot (Frees et al. 2004). Zdá se, že by mohlo být ClpX zapojeno do jiných regulačních drah u *Xanthomonas*, anebo zde funguje jako šaperon teplotního stresu na rozdíl od *S. aureus*, kde tuto roli zastává především šaperon ClpC (Frees et al. 2004; Stahlhut et al. 2017). Z provedené studie je nám znám pouze vliv ClpX u *Xanthomonas* vystaveným stresovým podmínkám, ale není dosud známo, do jakých regulačních drah je zapojen. Pro větší pochopení jeho působení je třeba další výzkum.

6 ClpX a ClpP jako nový cíl antimikrobiálních látek k obnovení citlivosti rezistentních patogenů

Antimikrobiální rezistence (AMR) představuje závažnou globální hrozbu pro lidi, zvířata a životní prostředí a je jednou z nejvyšších zdravotnických výzev 21. století. Problematika AMR je v šíření a přetrvání multirezistentních bakterií. Mezi možné příčiny vysokého výskytu AMR patří nadměrné užívání antibiotik u lidí i zvířat, volná dostupnost některých antibiotik a uvolňování nemetabolizovaných antibiotik nebo jejich zbytků do prostředí prostřednictvím hnoje či trusu. Tyto faktory vedly k vyvinutí silného selekčního tlaku, který zapříčinil vznik multirezistentních kmenů. V důsledku šíření AMR ATM látky přestávají být účinné v boji proti těmto multirezistentním patogenům. Z tohoto důvodu je důležité, aby došlo k vývoji nových alternativních strategií v boji proti těmto bakteriálním kmenům (Aslam et al. 2018).

Jedním z možných alternativních cílů k obnovení rezistence multirezistentních bakterií jsou proteiny ClpX a ClpP. Tyto proteiny mají zásadní vliv na virulenci a rezistenci mnoha bakteriálních kmenů způsobující vážná onemocnění (Frees et al. 2003; McGillivray et al. 2009; Jensen et al. 2019a; Roy et al. 2019). Jelikož se jedná o velice rozšířenou skupinu proteinů, vyskytující se napříč celou bakteriální říší, jsou ideálním cílem pro vývoj nových antibakteriálních látek (McGillivray et al. 2009; Moreno-Cinos et al. 2019). Efektivní zrušení aktivity ClpX by nesloužila k přímému zabití patogenu, ale k tomu, aby byl náchylný k likvidaci vrozeným imunitním systémem (McGillivray et al. 2009).

Nová třída ATM látek ADEP se zaměřuje na ClpXP proteolytický komplex, konkrétněji na proteázu ClpP (Brötz-Oesterhelt et al. 2005). ADEP soupeří o vazebná místa (hydrofobní kapsy) na ClpP s ATPázou ClpX, přičemž obsazení jedné ze sedmi hydrofobních kapes ClpP účinně brání vazbě ClpX (Gersch et al. 2015). Vazba ADEP na ClpP způsobí konformační změny viz. kapitola 3.1.3. Tyto konformační změny způsobí aktivaci proteázy ClpP a ta bez přítomnosti ClpX začne nespecificky degradovat proteiny, což vede posléze k buněčné smrti (Brötz-Oesterhelt et al. 2005; Kirstein et al. 2009).

Zajímavého výsledku bylo dosaženo při společném podání ADEP s antibiotikem rifampicinem. Podání této antimikrobiální směsi dokázalo eradikovat chronickou infekci *S. aureus* v myším modelu. Eradikace biofilmu ve zvířecím modelu je dobrým začátkem pro zavedení ADEP/rifampicinové léčby do klinické praxe (Conlon et al. 2013).

7 Závěr

ClpX je hexamerická ATPáza rodiny AAA+ proteáz, která je schopná interagovat s tetradekamerickou proteázou ClpP za tvorby proteolytického komplexu ClpXP nebo pracuje zcela nezávisle na ClpP jako molekulární šaperon. Tvorba proteolytického komplexu je umožněna díky vzájemným interakcím sekvenčních motivů obou podjednotek. Vzájemná interakce podjednotek proteolytického komplexu způsobí, že jinak samostatně neaktivní proteáza ClpP, se stává aktivní. ClpX v tomto proteolytickém komplexu plní několik funkcí: rozpoznává substráty určené k degradaci pomocí krátkých nestrukturovaných sekvencí nacházející se na koncích proteinů a mechanickou práci zprostředkovanou hydrolytickými cykly ATP rozbaluje a translokuje substráty do degradační komory proteázy ClpP. Tato funkce ClpX patří k obecným funkcím, které můžeme nalézt u každého bakteriálního druhu.

U patogenních bakterií, jako je *S. aureus* nebo *B. anthracis*, ClpX ovlivňuje samostatně, či ve spojení s ClpP, produkci řady virulentních faktorů, faktorů zodpovědných za toleranci vůči stresovým podmínkám, a faktorů podílejících se na buněčném dělení či na syntéze buněčné stěny.

Z tohoto důvodu a také proto, že ClpX i ClpP jsou konzervované napříč celou bakteriální říší, jsou přímo ideálním cílem pro antimikrobiální léčbu k obnovení rezistence bakterií. V dnešní době je známa řada ATM látek zaměřených na aktivitu ClpP, avšak jedna z nich se jeví jako velice slibný adept na uvedení do klinické praxe. Zmíněným adeptem je ATM látka ADEP, která způsobuje nespecifickou degradaci proteinů proteázou ClpP. I když ADEP vykazuje dobré výsledky v obnovení rezistence bakterií, není jisté, zdali tato ATM látka projde klinickými testy. Z toho důvodu je důležité hledat další alternativy ATM látek pomocí, kterých bychom mohli obejít antibiotickou rezistenci například cestou inaktivace ClpX či navozením neregulované proteolýzy jako v případě ADEP.

8 Přehled použité literatury

ALEXOPOULOS, John, Bilal AHSAN, Lopamudra HOMCHAUDHURI, Nabih HUSAIN, Yi-Qiang CHENG a Joaquin ORTEGA, 2013. Structural determinants stabilizing the axial channel of ClpP for substrate translocation. *Molecular Microbiology* [online]. **90**(1), ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.12356

ASLAM, Bilal, Wei WANG, Muhammad Imran ARSHAD, Mohsin KHURSHID, Saima MUZAMMIL, Muhammad Hidayat RASOOL, Muhammad Atif NISAR, Ruman Farooq ALVI, Muhammad Aamir ASLAM, Muhammad Usman QAMAR, Muhammad Khalid Farooq SALAMAT a Zulqarnain BALOCH, 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* [online]. **Volume 11**, 1645–1658. ISSN 1178-6973. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S173867

BÆK, Kristoffer T., Lisa BOWMAN, Charlotte MILLERSHIP, Dupont SØGAARD, Volkhard KAEVER, Pia SILJAMÄKI, Kirsi SAVIJOKI, Mia DUPONT SØGAARD, Volkhard KAEVER, Pia SILJAMÄKI, Kirsi SAVIJOKI, Pekka VARMANEN, Tuula A. NYMAN, Angelika GRÜNDLING a Dorte FREES, 2016. The Cell Wall Polymer Lipoteichoic Acid Becomes Nonessential in. *mBio* [online]. **7**(4), 1–11. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01228-16

BAKER, Tania A. a Robert T. SAUER, 2012. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [online]. B.m.: Elsevier B.V., **1823**(1), 15–28. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.007

BATTESTI, Aurelia, Joel R. HOSKINS, Song TONG, Paola MILANESIO, Jessica M. MANN, Andrea KRAVATS, Yodit M. TSEGAYE, Alexandre BOUGDOUR, Sue WICKNER a Susan GOTTESMAN, 2013. Anti-adaptors provide multiple modes for regulation of the RssB adaptor protein. *Genes and Development* [online]. **27**(24), 2722–2735. ISSN 08909369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.229617.113

BELL, Tristan A, Tania A BAKER a Robert T SAUER, 2019. Interactions between a subset of substrate side chains and AAA+ motor pore loops determine grip during protein unfolding. *eLife* [online]. **8**. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.46808

BEURON, Fabienne, Michael R. MAURIZI, David M. BELNAP, Eva KOCSIS, Frank P. BOOY, Martin KESSEL a Alasdair C. STEVEN, 1998. At sixes and sevens: Characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *Journal of Structural Biology* [online]. **123**(3), 248–259. ISSN 10478477. Dostupné z: doi:10.1006/jsbi.1998.4039

BOLON, Daniel N., David A. WAH, Greg L. HERSCH, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2004a. Bivalent Tethering of SspB to ClpXP Is Required for Efficient Substrate Delivery. *Molecular Cell* [online]. **13**(3), 443–449. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(04)00027-9

BOLON, Daniel N, Robert A GRANT, Tania A BAKER a Robert T SAUER, 2004b. Nucleotide-Dependent Substrate Handoff from the SspB Adaptor to the AAA+ ClpXP Protease. *Molecular Cell* [online]. **16**(3), 343–350. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2004.10.001

BOUZIANAS, Dimitrios G., 2009. Medical countermeasures to protect humans from anthrax bioterrorism. *Trends in Microbiology* [online]. **17**(11), 522–528. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2009.08.006

BRÖTZ-OESTERHELT, Heike, Dieter BEYER, Hein Peter KROLL, Rainer ENDERMANN, Christoph LADEL, Werner SCHROEDER, Berthold HINZEN, Siegfried RADDATZ, Holger PAULSEN, Kerstin HENNINGER, Julia E. BANDOW, Hans Georg SAHL a Harald LABISCHINSKI, 2005. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nature Medicine* [online]. **11**(10), 1082–1087. ISSN 10788956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1306

- BYUNG JOON HWANG, KEE MIN WOO, A. L. GOLDBERG a CHIN HA CHUNG, 1988. Protease Ti, a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*, contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits. *Journal of Biological Chemistry*. **263**(18), 8727–8734. ISSN 00219258. Dostupné z: PMID:2967816
- CHADANI, Yuhei, Katsuhiko ONO, Kazuhiro KUTSUKAKE a Tatsuhiko ABO, 2011. *Escherichia coli* YaeJ protein mediates a novel ribosome-rescue pathway distinct from SsrA- and ArfA-mediated pathways. *Molecular Microbiology* [online]. **80**(3), 772–785. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07607.x
- CHADANI, Yuhei, Katsuhiko ONO, Shin Ichiro OZAWA, Yuichiro TAKAHASHI, Kazuyuki TAKAI, Hideaki NANAMIYA, Yuzuru TOZAWA, Kazuhiro KUTSUKAKE a Tatsuhiko ABO, 2010. Ribosome rescue by *Escherichia coli* ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system. *Molecular Microbiology* [online]. **78**(4), 796–808. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07375.x
- CLAUNCH, Kevin M., Madeline BUSH, Christopher R. EVANS, Jacob A. MALMQUIST, Matthew C. HALE a Shauna M. MCGILLIVRAY, 2018a. Transcriptional profiling of the clpX mutant in *Bacillus anthracis* reveals regulatory connection with the lrgAB operon. *Microbiology (United Kingdom)* [online]. **164**(4), 659–669. ISSN 14652080. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.000628
- CLAUNCH, Kevin M., Madeline BUSH, Christopher R. EVANS, Jacob A. MALMQUIST, Matthew C. HALE a Shauna M. MCGILLIVRAY, 2018b. Transcriptional profiling of the clpX mutant in *Bacillus anthracis* reveals regulatory connection with the lrgAB operon. *Microbiology* [online]. **164**(4), 659–669. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.000628
- CONLON, B. P., E. S. NAKAYASU, L. E. FLECK, M. D. LAFLEUR, V. M. ISABELLA, K. COLEMAN, S. N. LEONARD, R. D. SMITH, J. N. ADKINS a K. LEWIS, 2013. Activated ClpP kills persists and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **503**(7476), 365–370. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12790
- DONALDSON, Logan W., Urszula WOJTYRA a Walid A. HOURY, 2003. Solution structure of the dimeric zinc binding domain of the chaperone ClpX. *The Journal of biological chemistry* [online]. **278**(49), 48991–48996. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M307826200
- DORICH, Victoria, Christiane BRUGGER, Arti TRIPATHI, Joel R. HOSKINS, Song TONG, Margaret M. SUHANOVSKY, Amita SASTRY, Sue WICKNER, Susan GOTTESMAN a Alexandra M. DEACONESCU, 2019. Structural basis for inhibition of a response regulator of σ S stability by a ClpXP antiadaptor. *Genes and Development* [online]. **33**(11–12), 718–732. ISSN 15495477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.320168.118
- DOUGAN, David A., Eilika WEBER-BAN a Bernd BUKAU, 2003. Targeted delivery of an ssrA-tagged substrate by the adaptor protein SspB to its cognate AAA+ protein ClpX. *Molecular Cell* [online]. **12**(2), 373–380. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2003.08.012
- ENEMARK, Eric J. a Leemor JOSHUA-TOR, 2006. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* [online]. **442**(7100), 270–275. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature04943
- FARRELL, Christopher M., Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2007. Altered Specificity of a AAA+ Protease. *Molecular Cell* [online]. **25**(1), 161–166. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2006.11.018
- FEI, Xue, Tristan A. BELL, Simon JENNI, Benjamin M. STINSON, Tania A. BAKER, Stephen C. HARRISON a Robert T. SAUER, 2020. Structures of the ATP-fueled ClpXP proteolytic machine bound to protein substrate. *eLife* [online]. **9**, 1–22. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.52774

- FLYNN, J. M., I. LEVCHENKO, M. SEIDEL, S. H. WICKNER, R. T. SAUER a T. A. BAKER, 2001. Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **98**(19), 10584–10589. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.191375298
- FLYNN, Julia M., Igor LEVCHENKO, Robert T. SAUER a Tania A. BAKER, 2004. Modulating substrate choice: The SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes and Development* [online]. **18**(18), 2292–2301. ISSN 08909369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1240104
- FLYNN, Julia M., Saskia B. NEHER, Yong In KIM, Robert T. SAUER a Tania A. BAKER, 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Molecular Cell* [online]. **11**(3), 671–683. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(03)00060-1
- FOSTER, T. J. a D. MCDEVITT, 1994. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: Their possible roles in virulence. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **118**(3), 199–205. ISSN 15746968. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06828.x
- FREES, Dorte, Arnaud CHASTANET, Saara QAZI, Karen SØRENSEN, Philip HILL, Tarek MSADEK a Hanne INGMER, 2004. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* [online]. **54**(5), 1445–1462. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04368.x
- FREES, Dorte, Saara N.A. QAZI, Philip J. HILL a Hanne INGMER, 2003. Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Molecular Microbiology* [online]. **48**(6), 1565–1578. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03524.x
- FREES, Dorte, Karen SØRENSEN a Hanne INGMER, 2005. Global Virulence Regulation in. *Society* [online]. **73**(12), 8100–8108. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.73.12.8100
- GAILLOT, Ollvier, Elisabeth PELLEGRINI, Søren BREGENHOLT, Shamila NAIR a Patrick BERCHE, 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* [online]. **35**(6), 1286–1294. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01773.x
- GATSOGIANNIS, Christos, Dora BALOGH, Felipe MERINO, Stephan A. SIEBER a Stefan RAUNSER, 2019. Cryo-EM structure of the ClpXP protein degradation machinery. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. B.m.: Springer US, **26**(10), 946–954. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/s41594-019-0304-0
- GERSCH, Malte, Kirsten FAMULLA, Maria DAHMEN, Christoph GÖBL, Imran MALIK, Klaus RICHTER, Vadim S. KOROTKOV, Peter SASS, Helga RÜBSAMEN-SCHAEFF, Tobias MADL, Heike BRÖTZ-OESTERHELT a Stephan A. SIEBER, 2015. AAA+ chaperones and acyldepsipeptides activate the ClpP protease via conformational control. *Nature Communications* [online]. **6**. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms7320
- GLYNN, Steven E., Andreas MARTIN, Andrew R. NAGER, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2009. Structures of Asymmetric ClpX Hexamers Reveal Nucleotide-Dependent Motions in a AAA+ Protein-Unfolding Machine. *Cell* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **139**(4), 744–756. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.09.034
- GLYNN, Steven E., Andrew R. NAGER, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2012. Dynamic and static components power unfolding in topologically closed rings of a AAA+ proteolytic machine. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. **19**(6), 616–622. ISSN 15459993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.2288
- GOTTESMAN, Susan, William P CLARK, Valerie De CRECY-LAGARD a R MAURIZI, 1993. ClpX, an Alternative Subunit for the ATP-dependent Clp Protease of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **268**(30), 22618–22626. Dostupné z: PMID: 8226770

- GOTTESMAN, Susan, Eric ROCHE, Y. ZHOU a Robert T. SAUER, 1998. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes & Development* [online]. B.m.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **12**(9), 1338–1347. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.12.9.1338
- GRIMAUD, Regis, Martin KESSEL, Fabienne BEURON, Alasdair C. STEVEN a Michael R. MAURIZI, 1998. Enzymatic and structural similarities between the Escherichia coli ATP- dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **273**(20), 12476–12481. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.20.12476
- GUR, Eyal, Dvora BIRAN a Eliora Z. RON, 2011. Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria- how and when? *Nature Reviews Microbiology* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **9**(12), 839–848. ISSN 17401526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2669
- HIMENO, Hyouta, Daisuke KURITA a Akira MUTO, 2014. TmRNA-mediated trans-translation as the major ribosome rescue system in a bacterial cell. *Frontiers in Genetics* [online]. **5**(APR), 1–13. ISSN 16648021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2014.00066
- HSIEH, Hsin Yeh, Wen Tseng CHING a George C. STEWART, 2008. Regulation of rot expression in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology* [online]. **190**(2), 546–554. ISSN 00219193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00536-07
- HUNTZINGER, Eric, Sandrine BOISSET, Cosmin SAVEANU, Yvonne BENITO, Thomas GEISSMANN, Abdelkader NAMANE, Gérard LINA, Jerome ETIENNE, Bernard EHRESMANN, Chantal EHRESMANN, Alain JACQUIER, François VANDENESCH a Pascale ROMBY, 2005. Staphylococcus aureus RNAPIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO Journal* [online]. **24**(4), 824–835. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7600572
- JELSBÄK, Lotte, Hanne INGMER, Lukás VALIHRACH, Marianne Thorup COHN, Mie H.G. CHRISTIANSEN, Birgitte H. KALLIPOLITIS a Dorte FREES, 2010. The chaperone ClpX stimulates expression of Staphylococcus aureus protein A by rot dependent and independent pathways. *PLoS ONE* [online]. **5**(9), 1–11. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0012752
- JENAL, Urs a Thomas FUCHS, 1998. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO Journal* [online]. **17**(19), 5658–5669. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/17.19.5658
- JENSEN, Camilla, Kristoffer T. BÆK, Clement GALLAY, Ida THALSØ-MADSEN, Lijuan XU, Ambre JOUSSELIN, Fernando RUIZ TORRUBIA, Wilhelm PAULANDER, Ana R. PEREIRA, Jan-Willem VEENING, Mariana G. PINHO a Dorte FREES, 2019a. The ClpX chaperone controls autolytic splitting of Staphylococcus aureus daughter cells, but is bypassed by β -lactam antibiotics or inhibitors of WTA biosynthesis. *PLOS Pathogens* [online]. **15**(9), e1008044. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1008044
- JENSEN, Camilla, Marie J FOSBERG, Ida THALSØ-MADSEN, Kristoffer T BÆK a Dorte FREES, 2019b. Staphylococcus aureus ClpX localizes at the division septum and impacts transcription of genes involved in cell division, T7-secretion, and SaPI5-excision. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 1–11. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-52823-0
- JENUL, Christian a Alexander R. HORSWILL, 2019. Regulation of Staphylococcus aureus Virulence. *Gram-Positive Pathogens* [online]. **6**(1), 669–686. Dostupné z: doi:10.1128/9781683670131.ch41
- JOSHI, Shilpa A., Greg L. HERSCH, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2004. Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. **11**(5), 404–411. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb752
- KARZAI, A. W., 1999. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *The EMBO Journal* [online]. **18**(13), 3793–3799. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/18.13.3793

- KATAYAMA-FUJIMURA, Y., S. GOTTESMAN a M. R. MAURIZI, 1987. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **262**(10), 4477–4485. ISSN 00219258. Dostupné z: PMID:3549708
- KATAYAMA, Y., S. GOTTESMAN, J. PUMPHREY, S. RUDIKOFF, W. P. CLARK a M. R. MAURIZI, 1988. The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. *Journal of Biological Chemistry*. **263**(29), 15226–15236. ISSN 00219258. Dostupné z: PMID:3049606
- KEILER, Kenneth C., Patrick R.H. WALLER a Robert T. SAUER, 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* [online]. **271**(5251), 990–993. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.271.5251.990
- KIM, Dong Young a Kyeong Kyu KIM, 2003. Crystal Structure of ClpX Molecular Chaperone from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **278**(50), 50664–50670. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M305882200
- KIM, Yong In, Randall E. BURTON, Briana M. BURTON, Robert T. SAUER a Tania A. BAKER, 2000. Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Molecular Cell* [online]. **5**(4), 639–648. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(00)80243-9
- KIM, Yong In, Igor LEVCHENKO, Karolina FRACZKOWSKA, Rachel V. WOODRUFF, Robert T. SAUER a Tania A. BAKER, 2001. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp 100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nature Structural Biology* [online]. **8**(3), 230–233. ISSN 10728368. Dostupné z: doi:10.1038/84967
- KIRSTEIN, Janine, Anja HOFFMANN, Hauke LILIE, Ronny SCHMIDT, Rubsamen Waigmann HELGA, Brötz Oesterhelt HEIKE, Axel MOGK a Kürşad TURGAY, 2009. The antibiotic ADEP reprogrammes Clp, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Molecular Medicine* [online]. **1**(1), 37–49. ISSN 17574684. Dostupné z: doi:10.1002/emmm.200900002
- KLAUCK, E., M. LINGNAU a R. HENGGE-ARONIS, 2001. Role of the response regulator RssB in (σ S recognition and initiation of (σ S proteolysis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* [online]. **40**(6), 1381–1390. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02482.x
- KOMINE, Yuriko, Makoto KITABATAKE, Takashi YOKOGAWA, Kazuya NISHIKAWA a Hachiro INOKUCHI, 1994. A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **91**(20), 9223–9227. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.20.9223
- KRUKLITIS, R., D. J. WELTY a H. NAKAI, 1996. ClpX protein of *Escherichia coli* activates bacteriophage Mu transposase in the strand transfer complex for initiation of Mu DNA synthesis. *The EMBO Journal* [online]. **15**(4), 935–944. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00428.x
- LABRECK, Christopher J., Shannon MAY, Marissa G. VIOLA, Joseph CONTI a Jodi L. CAMBERG, 2017. The Protein Chaperone ClpX Targets Native and Non-native Aggregated Substrates for Remodeling, Disassembly, and Degradation with ClpP. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. B.m.: Frontiers Media S.A., **4**(MAY). ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2017.00026
- LEVCHENKO, I., M. SEIDEL, R. T. SAUER a T. A. BAKER, 2000. A specificity-enhancing factor for the clpXP degradation machine. *Science* [online]. **289**(5488), 2354–2356. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.289.5488.2354
- LEVCHENKO, Igor, Robert A. GRANT, Julia M. FLYNN, Robert T. SAUER a Tania A. BAKER, 2005. Versatile modes of peptide recognition by the AAA+ adaptor protein SspB. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. **12**(6), 520–525. ISSN 15459993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb934

- LEVCHENKO, Igor, Robert A. GRANT, David A. WAH, Robert T. SAUER a Tania A. BAKER, 2003. Structure of a delivery protein for an AAA+ protease in complex with a peptide degradation tag. *Molecular Cell* [online]. **12**(2), 365–372. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2003.08.014
- LEVCHENKO, Igor, Li LUO a Tania A. BAKER, 1995. Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes and Development* [online]. **9**(19), 2399–2408. ISSN 08909369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.9.19.2399
- LIES, Mark a Michael R. MAURIZI, 2008. Turnover of endogenous SsrA-tagged proteins mediated by ATP-dependent proteases in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(34), 22918–22929. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M801692200
- LO, Hsueh Hsia, Chao Tsai LIAO, Chih En LI, Ying Chuan CHIANG a Yi Min HSIAO, 2019. The clpX gene plays an important role in bacterial attachment, stress tolerance, and virulence in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Archives of Microbiology* [online]. B.m.: Springer Berlin Heidelberg, (0123456789). ISSN 1432072X. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-019-01772-3
- MARTIN, Andreas, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2007. Distinct Static and Dynamic Interactions Control ATPase-Peptidase Communication in a AAA+ Protease. *Molecular Cell* [online]. **27**(1), 41–52. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2007.05.024
- MARTIN, Andreas, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2008. Pore loops of the AAA+ ClpX machine grip substrates to drive translocation and unfolding. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. **15**(11), 1147–1151. ISSN 15459993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.1503
- MAXSON & MITCHELL, 2018. Regulated proteolysis in bacteria. *Physiology & behavior* [online]. **176**(1), 139–148. Dostupné z: doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
- MCGILLIVRAY, Shauna M., Celia M. EBRAHIMI, Nathan FISHER, Mojgan SABET, Dawn X. ZHANG, Yahua CHEN, Nina M. HASTE, Raffi V. AROIAN, Richard L. GALLO, Donald G. GUINEY, Arthur M. FRIEDLANDER, Theresa M. KOEHLER a Victor NIZET, 2009. ClpX contributes to innate defense peptide resistance and virulence phenotypes of *Bacillus anthracis*. *Journal of Innate Immunity* [online]. **1**(5), 494–506. ISSN 1662811X. Dostupné z: doi:10.1159/000225955
- MHAMMEDI-ALAOUL, Amine, Martin PATO, Marie-Jo -J GAMA a Ariane TOUSSAINT, 1994. A new component of bacteriophage Mu replicative transposition machinery: the *Escherichia coli* ClpX protein. *Molecular Microbiology* [online]. **11**(6), 1109–1116. ISSN 13652958. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00387.x
- MORENO-CINOS, Carlos, Kenneth GOOSSENS, Irene G. SALADO, Pieter VAN DER VEKEN, Hans DE WINTER a Koen AUGUSTYNS, 2019. ClpP protease, a promising antimicrobial target. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(9). ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20092232
- POWERS, Evan T. a William E. BALCH, 2013. Diversity in the origins of proteostasis networks—a driver for protein function in evolution. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **14**(4), 237–248. ISSN 14710072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3542
- RAE, Christopher D., Yuliya GORDIYENKO a V. RAMAKRISHNAN, 2019. How a circularized tmRNA moves through the ribosome. *Science* [online]. **363**(6428), 740–744. ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aav9370
- RAMRATH, David J. F., Hiroshi YAMAMOTO, Kristian ROTHER, Daniela WITTEK, Markus PECH, Thorsten MIELKE, Justus LOERKE, Patrick SCHEERER, Pavel IVANOV, Yoshika TERAOKA, Olga SHPANCHENKO, Knud H. NIERHAUS a Christian M. T. SPAHN, 2012. The complex of tmRNA–SmpB and EF-G on translocating ribosomes. *Nature* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **485**(7399), 526–529. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature11006

- RIPSTEIN, Zev A., Rui HUANG, Rafal AUGUSTYNIAK, Lewis E. KAY a John L. RUBINSTEIN, 2017. Structure of a AAA+ unfoldase in the process of unfolding substrate. *eLife* [online]. **6**, 1–14. ISSN 2050084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.25754
- RIPSTEIN, Zev A., Siavash VAHIDI, Walid A. HOURY, John L. RUBINSTEIN a Lewis E. KAY, 2020. A processive rotary mechanism couples substrate unfolding and proteolysis in the ClpXP degradation machinery. *eLife* [online]. **9**, 1–25. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.52158
- ROY, Shipra, Yinchu ZHU, Jiale MA, Animesh Chandra ROY, Yue ZHANG, Xiaojun ZHONG, Zihao PAN a Huochun YAO, 2019. Role of ClpX and ClpP in *Streptococcus suis* serotype 2 stress tolerance and virulence. *Microbiological Research* [online]. B.m.: Elsevier, **223–225**(October 2018), 99–109. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2019.04.003
- RUDINGER-THIRION, J., R. GIEGE a B. FELDEN, 1999. Aminoacylated tmRNA from *Escherichia coli* interacts with prokaryotic elongation factor Tu. *Rna* [online]. **5**(8), 989–992. ISSN 13558382. Dostupné z: doi:10.1017/S135583829999101X
- SHIN, Mia, Ananya ASMITA, Cristina PUCHADES, Eric ADJEI, R Luke WISEMAN, A Wali KARZAI a Gabriel C LANDER, 2019. Distinct Structural Features of the Lon Protease Drive Conserved Hand-over-Hand Substrate Translocation. *bioRxiv* [online]. 617159. Dostupné z: doi:10.1101/617159
- SIDDIQUI, Samia M., Robert T. SAUER a Tania A. BAKER, 2004. Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates. *Genes and Development* [online]. **18**(4), 369–374. ISSN 08909369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1170304
- SINGH, Satyendra K., Jan ROZYCKI, Joaquin ORTEGA, Takashi ISHIKAWA, John LO, Alasdair C. STEVEN a Michael R. MAURIZI, 2001. Functional Domains of the ClpA and ClpX Molecular Chaperones Identified by Limited Proteolysis and Deletion Analysis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(31), 29420–29429. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M103489200
- STAHLHUT, Steen G., Abdulelah A. ALQARZAE, Camilla JENSEN, Niclas S. FISKEER, Ana R. PEREIRA, Mariana G. PINHO, Vinai Chittezhom THOMAS a Dorte FREES, 2017. The ClpXP protease is dispensable for degradation of unfolded proteins in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* [online]. B.m.: Springer US, **7**(1), 1–14. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-12122-y
- STINSON, Benjamin M., Andrew R. NAGER, Steven E. GLYNN, Karl R. SCHMITZ, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2013. Nucleotide binding and conformational switching in the hexameric ring of a AAA+ machine. *Cell* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **153**(3), 628–639. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.03.029
- THIBAUT, Guillaume, Jovana YUDIN, Philip WONG, Vladimir TSITRIN, Remco SPRANGERS, Rongmin ZHAO a Walid A. HOURY, 2006. Specificity in substrate and cofactor recognition by the N-terminal domain of the chaperone ClpX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **103**(47), 17724–17729. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0601505103
- THOMPSON, M. W., S. K. SINGH a M. R. MAURIZI, 1994. Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*. **269**(27), 18209–18215. ISSN 00219258. Dostupné z: PMID:8027082
- TU, Guo-Fen, Gavin E. REID, Jian-Guo ZHANG, Robert L. MORITZ a Richard J. SIMPSON, 1995. C-terminal Extension of Truncated Recombinant Proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA Decapeptide. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **270**(16), 9322–9326. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.16.9322

- USHIDA, Chisato, Hyouta HIMENO, Tsuneaki WATANABE a Akira MUTO, 1994. tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* [online]. **22**(16), 3392–3396. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/22.16.3392
- VICENTE, Joana G. a Eric B. HOLUB, 2013. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* [online]. **14**(1), 2–18. ISSN 14646722. Dostupné z: doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x
- VIMBERG, Vladimir, Jakub LENART, Jiri JANATA a Gabriela Balikova NOVOTNA, 2015. ClpP-independent function of ClpX interferes with telithromycin resistance conferred by Msr(A) in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **59**(6), 3611–3614. ISSN 10986596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.04367-14
- WAH, David A., Igor LEVCHENKO, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2002. Characterization of a specificity factor for an AAA+ ATPase: Assembly of SspB dimers with ssrA-tagged proteins and the ClpX hexamer. *Chemistry and Biology* [online]. **9**(11), 1237–1245. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/S1074-5521(02)00268-5
- WAH, David A., Igor LEVCHENKO, Gabrielle E. RIECKHOF, Daniel N. BOLON, Tania A. BAKER a Robert T. SAUER, 2003. Flexible linkers leash the substrate binding domain of SspB to a peptide module that stabilizes delivery complexes with the AAA+ ClpXP protease. *Molecular Cell* [online]. **12**(2), 355–363. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(03)00272-7
- WANG, Jimin, James A. HARTLING a John M. FLANAGAN, 1997. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP- dependent proteolysis. *Cell* [online]. **91**(4), 447–456. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80431-6
- WICKNER, Sue, Susan GOTTESMAN, Dorota SKOWYRA, Joel HOSKINS, Keith MCKENNEY a Michael R. MAURIZI, 1994. A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **91**(25), 12218–12222. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.25.12218
- WOJTKOWIAK, D., C. GEORGOPOULOS a M. ZYLICZ, 1993. Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **268**(30), 22609–22617. ISSN 00219258.
- WOJTYRA, Urszula A., Guillaume THIBAUT, Ashleigh TUIE a Walid A. HOURY, 2003. The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function. *The Journal of biological chemistry* [online]. **278**(49), 48981–48990. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M307825200
- ZHOU, Y., S. GOTTESMAN, J. R. HOSKINS, M. R. MAURIZI a S. WICKNER, 2001. The RssB response regulator directly targets σ S for degradation by ClpXP. *Genes and Development* [online]. **15**(5), 627–637. ISSN 08909369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.864401