

단백질 분해 표지, ssrA 시스템 (An ssrA-tagging system)

서론

단백질은 생체의 거의 모든 기능을 조절하는 로봇이다.¹ 이러한 단백질이 제대로 기능을 하기 위해서는 정확히 폴딩을 하여 기능에 맞는 삼차원 구조를 취하여야만 한다. 또한 기능을 다한 단백질들이 세포내에서 완전히 제거되거나, 특정 부분이 제거되어야만 정확한 기능을 하기도 하며, 특정 단백질이 제거되는 것이 세포내 현상의 기전(mechanism)이 되기도 한다. 물론 제대로 폴딩을 하지 못한 단백질들은 즉시 제거되어야 한다. 이러한 protein quality control을 위하여 세포내에는 많은 chaperone들과 protease들이 있고, 어떤 단백질 복합체들의 경우는 두 가지 기능을 모두 가지고 있으면서 상황에 따라서 로마의 신 야누스(Janus)처럼 정반대의 작용을 한다.^{2,3} 본 총설에서는 단백질을 제거하는 기전에 대해서 논하고자 하는데, 특히 리보솜(ribosome)에서 아미노산 체인이 생성되는 단계가 잘못된 경우 어떻게 이러한 non-native 단백질들이 세포내에서 제거되는지 소개할 것이다.

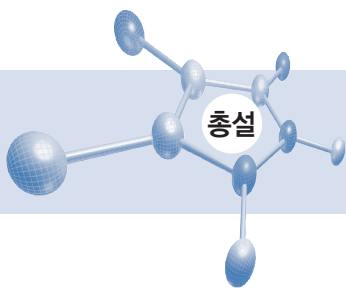
진핵생명체들은 제거하고자 하는 단백질에 유비퀴틴(ubiquitin)이라는 작은 단백질을 붙이고, 이를 인식하는 프로테오솜(proteasome)에 의하여 표적 단백질을 아미노산으로 분해시킨다.^{4,5} 원핵생명체들은 유비퀴틴-프로테오솜 시스템이 없지만 다른 여러 방법으로 단백질들을 제거하는데, 그 중 단백질을 분해하라는 신호로 잘 알려진 시스템이 ssrA-tagging법이다.^{6,7} 특정 조건 (예를 들면 영양분 부족상태, miscoding 항생제 투여, rare codon, 카르복시-말단에 Xaa-Pro같은 특정 잔기가 올 때, 유전자가 부서진 경우 등)에서는 리보솜의 기능이 효율적이지 못하여 단백질 생산을 빨리 하지 못하고 멈추게 되는데, 이러한 경우에는 잘못된 단백질이 만들어지기 쉽고, 이러한 잘못된 단백질은 생체내에서 즉시 제거되어야만 한다. 이때 이용되는 단백질 분해 표지가 ssrA-tag이다.

ssrA-tag의 발견

1990년대 중반 Simpson 박사 그룹은 대장균을 이용하여 인터루킨-6 유전자 재조합 단백질을 만드는 과정에서, 발견된 단백질의 5-10% 정도가 카르복시-말단 (carboxy-terminal) 부분에 특이한 변형이 생기는 것을 발견하였다.⁸ 이를 확인한 결과, 카르복시-말단쪽에 잘려져 나간 여러 종류의 작은 크기



송 현 규
고려대학교 생명과학부 조교수
hksong@korea.ac.kr



의 단백질이 만들어졌고, 이들은 카르복시-말단에 특정 아미노산 표지 (Ala-Ala-Asn-Asp-Glu-Asn-Tyr-Ala-Leu-Ala-Ala-COOH)가 붙어 있었다. 이 아미노산 서열은 이전에 이미 알려져 있던 대장균의 10Sa RNA의 전사 산물이었다.⁹ 실제로 이 10Sa RNA가 없는 돌연변이 대장균을 가지고 발현 실험을 한 경우는 위에서 보여진 특정 아미노산 표지가 나타나지 않았다.⁸ 10Sa RNA는 이미 1970년대 말에 대장균의 10S RNA 분획에서 발견되었으며, 크기가 작고 대사적으로 안정한 RNA이다.⁹ 이러한 10Sa RNA는 *ssrA* 유전자라고 불리웠으며, 후에 특성이 많이 연구되어 tmRNA라고도 이름이 붙여졌다. *ssrA*-tag 자체에 대한 것은 후에 다시 언급하기로 하고, *ssrA*를 아미노산 체인 뒤에 붙이는 과정에 필요한 tmRNA와 그 분자 기전에 대해 먼저 설명하겠다.

ssrA-tag을 coding하는 tmRNA

tmRNA는 원핵생명체에 존재하는 매우 특이한 RNA로 tRNA (transfer-RNA)와 mRNA (messenger-RNA)의 성질을 동시에 가지고 있다.¹⁰ tRNA와 비슷한 성질이 있다는 것은 결핵균의 10Sa RNA의 염기서열에서 tRNA의 T stem-loop과 유사한 부분이 인식되면서 알려졌다.¹¹ 그 후 주의 깊게 대장균과 바실러스 (*Bacillus*) 등의 유전자를 고찰한 결과 반쪽의 tRNA 구조를 tmRNA가 소유하고 alanylation도 되어 있었다.¹² D-loop에 해당하는 염기서열중 T-loop와 상호작용을 하는 곳으로 알려진 부분은 상당히 보존되어 있다.¹² tmRNA 전구체는 ribonuclease P에 의하여 5' -말단이,¹² RNAse III에 의하여 3' -말단이 잘려나간다.¹³ tmRNA가 mRNA처럼 coding되는 것은 앞서 언급한 대장균으로 외부 유전자를 대량 발현시키는 실험에서 처음 보여졌다.⁸ 특정 아미노산 서열을 coding하는 염기서열이 있고 그 바로 뒤에는 stop codon (UAA) 또한 존재한다. Fig. 1은 대장균의 tmRNA의 이차구조를 보여주는 것이다.

tmRNA는 Blast와 Patscan 등의 프로그램으로 여러 박테리아에서 계속 발견되어 가고 있고 진화적으로 매우 보존되어있는 것을 알 수 있다. 전체 게놈 서열이 밝혀진 모든 박테리아와 thermophile, cyanocacteria뿐만 아니라, 일부의 파아지(phage), 미토콘드리아, 플라스티드 게놈과 적색 계열 엽록체 (chloroplast

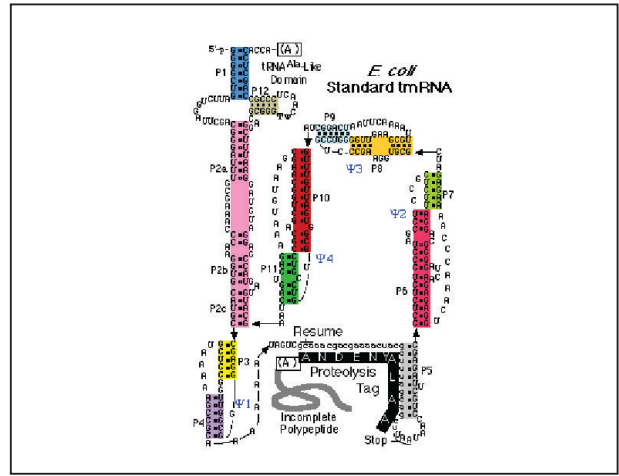


Fig. 1. Secondary structure for standard tmRNA from *Escherichia coli*. Figure adapted from the tmRNA website (<http://www.indiana.edu/~tmrna/>).

of the "red" lineage - red algae, diatom, colorless algae)에서도 발견되었다. 아직까지는 녹색 계열 엽록체 (green algae, higher plant)에서와 archaea 또는 진핵세포의 핵에서는 발견되지 않고 있다 (<http://www.indiana.edu/~tmrna/>). 현재까지 총 462종의 생명체에서 569개의 tmRNA의 염기서열이 밝혀졌다 (2005년 2월 22일 현재). *In vivo*에서 70S 리보솜과 tmRNA는 직접 결합하고, 리보솜 10개당 대략 한 개의 tmRNA 분자가 발견된다.^{14,15} tmRNA가 리보솜에 어떻게, 어디에 붙어있는지는 극저온 전자현미경 (cryo-EM) 기술에 의하여 밝혀졌다.¹⁶

ssrA가 붙은 단백질의 생성

tmRNA가 어떻게 trans-translation 과정에 관여하는지에 대한 모델은 MIT대학의 Robert Sauer 교수 그룹에 의하여 처음 제시되었다 (Fig. 2).^{6,17} 그들은 부서진 mRNA의 경우를 이용하여 기전을 설명하였는데, 1) 리보솜이 부서진 mRNA를 만나면 더 이상 진행을 하지 못하고 멈추게 된다. 이때 tmRNA가 리보솜의 A-site에 들어가게 된다. 2) tmRNA의 3' -끝쪽에 알라닌(alanine)으로 nascent 폴리 펩타이드 체인이 전달되는데, 이것이 *ssrA*-tag의 첫 번째 알라닌이 된다. 3) 부서진 mRNA가 tmRNA reading frame에 맞추어 coding되고 부서진 mRNA는 리보솜에서 떨어져 나가게 된다. 4) 체인 elongation은 계속 일어나고 이

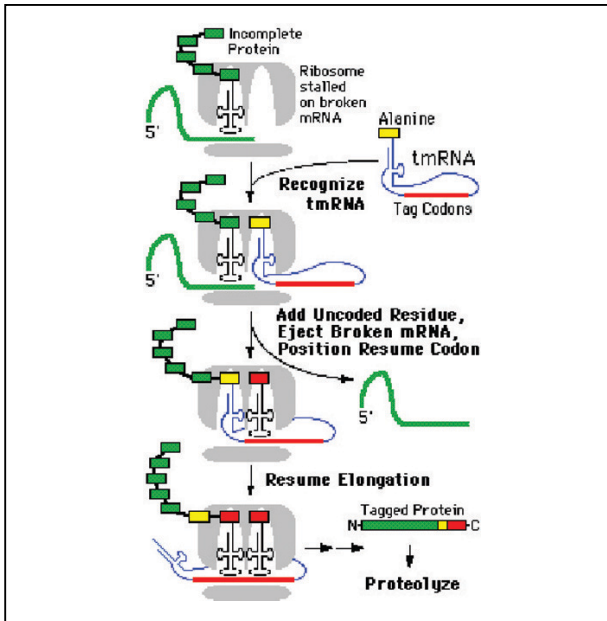


Fig. 2. The tmRNA model for ssrA mediated tagging of proteins. Figure adapted from the tmRNA website (<http://www.indiana.edu/~tmrna/>).

과정으로 (A)ANDENYALAA의 표지가 카르복시-말단에 붙게 된다. 5) tmRNA의 stop codon을 이용하여 아미노산 체인 형성이 멈추고 리보솜에서 생성된 폴리 펩타이드 체인은 빠져나오게 된다.

이와 같이 nascent 폴리 펩타이드 체인에 ssrA 표지를 붙일 때는 리보솜과 tmRNA 외에도 SmpB (Small protein B)라는 분자량이 작은 단백질이 필요한 것이 알려져 있다.¹⁸ SmpB는 아미노-말단쪽에 RNA와 결합할 수 있는 폴딩을 한 도메인과 카르복시-말단쪽에 protease에 의해 잘려지기 쉬운 tail로 구성되어 있다. 이 SmpB의 RNA 결합 도메인의 구조는 핵자기 공명학(NMR)방법으로 규명되었고,¹⁹ tmRNA의 t-RNA 부분과의 복합체의 결정 구조도 보고 되었다.²⁰ SmpB는 이 도메인을 이용하여 tmRNA와 안정적인 복합체를 형성하고, 이 둘은 다시 리보솜과 강력히 결합을 하게 된다. 최근에는 이외에도 SmpB 카르복시-tail 부분이 trans-translation 단계, 특히 리보솜의 A-부분에 tmRNA가 위치하는데 결정적인 역할을 한다는 것이 보고되었다.²¹ 이러한 ssrA 표지가 붙은 채로 세포질로 나오게 되는 단백질 기질들은 원핵생명체 내에 존재하는 많은 protease에 의하여 인식되고 제거된

다. 이러한 ssrA 표지는 protease에 의하여 직접 인지되기도 하지만, 특정 factor가 관여하기도 하는데 잘 알려진 것이 SspB (Stringent starvation protein B) 단백질이다.²²

ssrA-tag 인식 단백질 SspB

영양분이 고갈된 상태에서 대장균을 배양하고, 2차원 전기영동법을 수행하여 대량으로 발현된 단백질들을 확인하는 과정에서 SspB는 발견되었다.²³ 이후 SspB 단백질의 기능을 한 동안 모르다가, ClpXP 복합체로 ssrA-tag 단백질들을 전달해준다는 사실을 발견한 후에 다음과 같은 정보를 얻을 수 있었다.²² 박테리아가 영양분이 부족할 경우 리보솜이 새로운 아미노산 체인 형성을 빨리 할 수 없고, 생체 내에 꼭 필요한 단백질을 만들기 위해서는 잘못 만들어지고 있는 단백질 또는 꼭 필요하지 않은 단백질들을 가수분해하여야 한다. 이때 ssrA-tagging 시스템이 이용되는 것이다. 즉, 영양분 부족상태에서 많이 발현되는 SspB 단백질은 리보솜에서 생성된 ssrA가 붙은 기질들을 ClpXP 단백질로 전달해 주고, ClpXP는 이를 아미노산 수준으로 가수분해한 뒤, 리보솜은 다른 단백질을 만들기 위해서 이 아미노산들 다시 이용하는 것이다.

SspB 단백질은 dimer의 구조를 하고 있고, 아미노-말단의 긴 알파-헬릭스(helix)를 이용하여 dimer가 형성된다 (Fig. 3).²⁴⁻²⁶

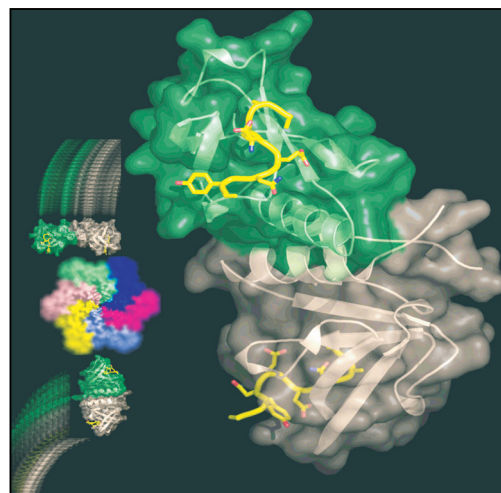


Fig. 3. Structure of the SspB-ssrA complex. Ribbon diagram of dimeric SspB with transparent surface is drawn. Each subunit is colored green and salmon, respectively. The bound ssrA peptide is also shown in yellow.

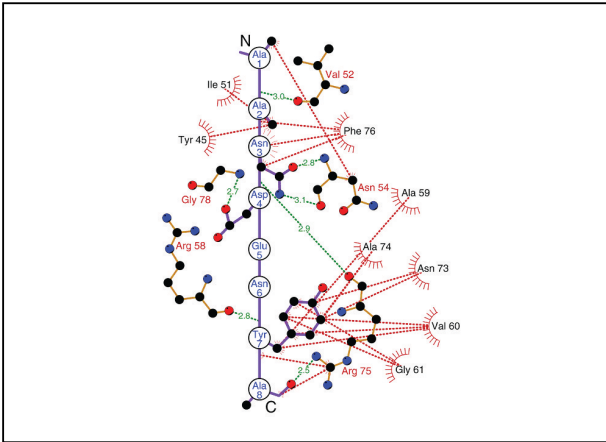
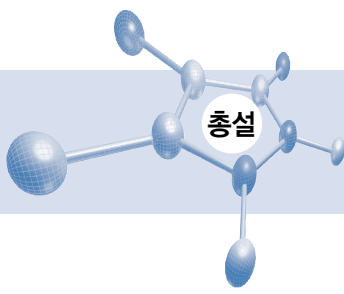


Fig. 4. Schematic diagram showing interactions between SspB and the ssrA peptide. Hydrophobic interactions are denoted by red starbursts and dashed lines; hydrogen bonding interactions by green dashed lines.

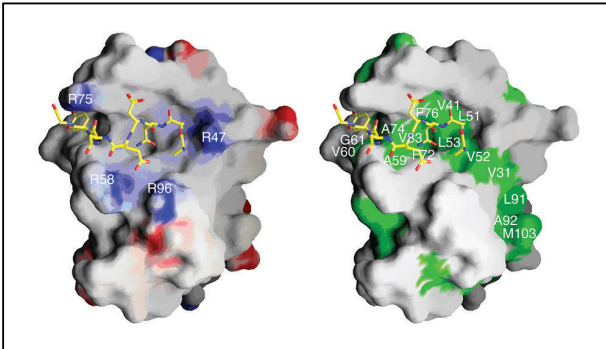


Fig. 5. ssrA-peptide binding site of SspB. (Left) Electrostatic surface representation of SspB. Negatively charged regions are red and positively charged regions blue. (Right) Hydrophobic surface representation of SspB. Residues forming the hydrophobic surfaces of SspB are colored green and labeled. Note the extended hydrophobic channel that extends beyond the ssrA binding region.

Fig. 3에서 보는 것과 같이 ssrA 펩타이드와 복합체 형태로 고해상도 구조가 규명되어 단백질이 어떻게 ssrA-tag을 인식하는지에 대한 정보를 알 수 있었다. ssrA 펩타이드 (AANDENYALAA)는 그 서열에서도 알 수 있듯이 매우 소수성(hydrophobicity)이 강하다. 11개의 ssrA 아미노산 서열 중 첫째, 둘째 알라닌과 일곱번째의 타이로신(tyrosine) 잔기가 SspB 단백질의 소수성 잔기들 (Tyr45, Ile51, Val60, Gly61, Ala74, Phe76등)과 상호작용을 하고 있다 (Fig. 4). 이러한 단백질과 펩타이드 간의 소수성 결합 외

에도 SspB가 ssrA-tag을 인식하기 위해서는 이온결합도 관여한다 (Fig. 5, 왼쪽). 한가지 흥미로운 사실은 SspB 단백질과 ssrA 펩타이드간의 결합 정도를 나타내는 해리상수가 ssrA를 카르복시-말단에 가지고 있는 단백질(GFP-ssrA)과의 해리상수보다 높다는 것이다.^{24,27} 이는 SspB 단백질에 존재하는 소수성 잔기가 모인 표면이 ssrA의 결합부위 앞쪽으로 존재하는 것으로 명확히 설명이 된다 (Fig. 5, 오른쪽).

SspB는 ssrA 결합 도메인과는 별도로 카르복시-말단쪽에 긴 tail이 존재하는데, 이 부위가 ClpX 단백질과 결합하는데 중요하며, 이 tail은 random coil의 conformation을 하고 있다.^{24,28} 많은 연구를 통하여 어떻게 SspB가 ssrA-tag을 인식하고, tail을 이용하여 ClpX에 결합을 한 뒤, ssrA가 부착된 단백질을 ClpX로 전달되는지에 대한 모델이 제시되었다 (Fig. 6).^{29,30} Fig. 6에서 보는 것과 같이 dimer의 SspB는 flexible한 tail을 이용하여 ClpX의 zinc finger 도메인에 붙는다. Tail의 flexibility를 이용하여 붙어있던 ssrA-tagged 단백질을 ClpX hexamer의 가운데 구멍

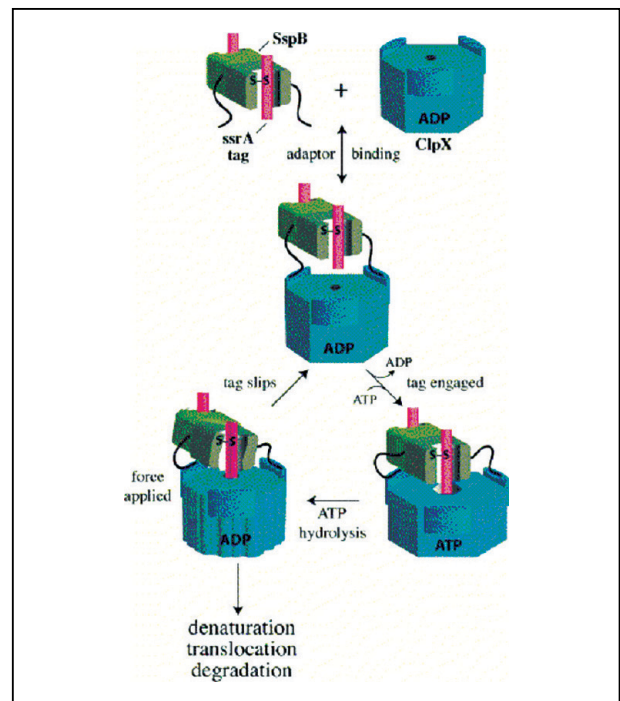


Fig. 6. Cartoon model of the assembly and processing of delivery complexes containing ClpX and the SspB protein. Figure adapted from Ref. 30.



으로 전달한다. ClpXP는 tetradecamer의 serine protease인 ClpP와 hexamer의 AAA-ATPase (ATPase associated with a variety of cellular activities)인 ClpX의 복합체이다.³¹ 현재까지 전체 복합체의 구조는 알려진 것이 없고, ClpP의 구조와 ClpX의 ATPase 도메인과 아미노-말단의 Zinc-finger 부분의 구조가 각각 밝혀져 있다.³²⁻³⁵ 하지만, 어떻게 *ssrA* 카르복시-말단의 Leu-Ala-Ala-COOH 서열이 ClpX에 의해서 인식되는지, 어떻게 ClpX 단백질이 SspB tail과 결합하는지 등에 대한 구조 정보가 없다.

향후 연구 방향

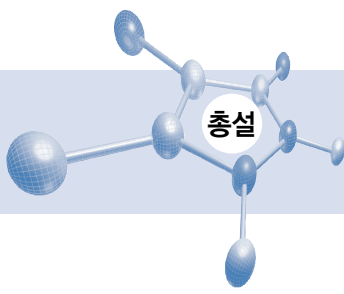
앞서 언급한 바와 같이 원핵생명체에서 단백질을 제거하는 기전에 대한 연구는 최근 몇 년간 많은 구조 정보의 축적으로 비약적인 발전이 있었다. 하지만, 아직도 많은 궁금증들이 남아있다. 발견되지 않았지만, archaea나 진핵세포의 핵에서 tmRNA를 찾고자 하는 연구가 진행되고 있다. 중간에 intron이 존재하는 tmRNA가 보고되는가 하면,³⁶ 두 유전자 조각으로 구성된 tmRNA 또한 데이터베이스가 늘어나면서 속속히 밝혀지고 있다.³⁷ tmRNA가 리보솜에 결합할 때 ribosomal protein S1이 관여하는 것으로 알려져 있고, tmRNA와 S1 단백질간의 상호작용에 대한 연구도 활발히 진행 중이다.³⁸ *ssrA* tag의 경우 어떻게 카르복시-말단의 잔기들이 ClpX에 의하여 인식되는가에 대한 연구가 필요하다. 또한 *ssrA*를 인식하는 것으로 알려진 SspB 단백질이 *ssrA*와는 서열면에서 전혀 연관성이 없는 RseA 단백질과 결합한다는 것이 최근에 알려져서, 어떻게 *ssrA*-tag과 RseA 단백질이 SspB의 같은 결합부위를 두고 경쟁하는지에 대한 의문점들이 있다.³⁹ 또한 *ssrA*와는 독립적으로 SspB 단백질이 어떻게 ClpX 단백질과 결합할 수 있고, 그 정확한 결합부위에 대한 정보가 많은 궁금증을 남기고 있다. ClpX가 *ssrA*의 카르복시-말단 3개 잔기를 인식하는 것과는 다르게, ClpP를 공유하는 유사한 ATPase인 ClpA의 경우는 첫째, 둘째, 여덟번째, 열번째 알라닌과 아홉번째 루신(leucine) 잔기를 인식하여, SspB 단백질과는 경쟁적인 결합을 한다.⁴⁰ 어떻게 이것이 가능한 것인가에 대한 연구도 진행되어야 할 것이다. ClpX의 경우는 2차원 전기 영동법을 이용하여 대장균내에 몇 가지 기질군이 확인되었다.⁴¹ 이러한 시도가

원핵생명체내의 유사 protease들(예를 들면, HslIVU 시스템)에 대해서도 진행되어야 할 것이다. 최근 Arc repressor의 아미노-말단의 잔기(MKGMKMPQFNLR)가 HslU에 의하여 인식되는 것이 보고되는 등 많은 연구가 진행되고 있다.⁴²

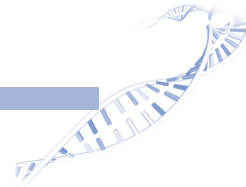
“이러한 연구 정보들의 축적으로 원핵생명체 protease들이 *ssrA*-tag을 포함한 가수분해 신호들을 어떻게 처리하는지에 대한 명쾌한 해답을 줄 것으로 기대된다.”

참고문헌

1. Tanford, C. and Reynolds, J. (2001) *Nature's robots: a history of proteins*. Oxford University Press, New York.
2. Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999) AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E97-98.
3. Dougan, D. A., Mogk, A. and Bukau, B. (2002) Protein folding and degradation in bacteria: To degrade or not to degrade? That is the question. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1607-1616.
4. Goldberg, A. L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.
5. Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
6. Karzai, A. W., Roche, E. D. and Sauer, R. T. (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.* 7, 449-455.
7. Withey, J. H. and Friedman, D. I. (2003) A salvage pathway for protein synthesis: tmRNA and trans-translation. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 101-123.
8. Tu, G. F., Reid, G. E., Zhang, J. G., Moritz, R. L. and Simpson, R. J. (1995) C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J. Biol. Chem.* 270, 9322-9326.
9. Ray, B. K. and Apirion, D. (1979) Characterization of 10S RNA: a new stable RNA molecule from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 174, 25-32.
10. Williams, K. P. (1999) The tmRNA website. *Nucleic Acids Res.* 27, 165-166.
11. Tyagi, J. S. and Kinger, A. K. (1992) Identification of the 10Sa



- RNA structural gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 20, 138.
12. Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Inokuchi, H. (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9223-9227.
 13. Srivastava, R. K., Miczak, A. and Apirion, D. (1990) Maturation of precursor 10Sa RNA in *Escherichia coli* is a two-step process: the first reaction is catalyzed by RNase III in presence of Mn²⁺. *Biochimie* 72, 791-802.
 14. Komine, Y., Kitabatake, M. and Inokuchi, H. (1996) 10Sa RNA is associated with 70S ribosome particles in *Escherichia coli*. *J Biochem. (Tokyo)* 119, 463-467.
 15. Ushida, C., Himeno, H., Watanabe, T. and Muto, A. (1994). tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 22, 3392-3396.
 16. Valle, M., Gillet, R., Kaur, S., Henne, A., Ramakrishnan, V. and Frank, J. (2003) Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science* 300, 127-130.
 17. Keiler, K. C., Waller, P. R. and Sauer, R. T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271, 990-993.
 18. Karzai, A. W., Susskind, M. M. and Sauer, R. T. (1999) SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J.* 18, 3793-3799.
 19. Dong, G., Nowakowski, J. and Hoffman, D. W. (2002) Structure of small protein B: the protein component of the tmRNA-SmpB system for ribosome rescue. *EMBO J.* 21, 1845-1854.
 20. Gutmann, S., Haebel, P. W., Metzinger, L., Sutter, M., Felden, B. and Ban, N. (2003) Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature* 424, 699-703.
 21. Jacob, Y., Sharkady, S. M., Bhardwaj, K., Sanda, A. and Williams, K. P. (2005) Function of the SmpB tail in transfer-messenger RNA translation revealed by a nucleus-encoded form. *J. Biol. Chem.* 280, 5503-5509.
 22. Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2000) A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. *Science* 289, 2354-2356.
 23. Williams, M. D., Ouyang, T. X. and Flickinger, M. C. (1994) Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in sspA on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol. Microbiol.* 11, 1029-1043.
 24. Song, H. K. and Eck, M. J. (2003) Structural basis of degradation signal recognition by SspB, a specificity-enhancing factor for the ClpXP proteolytic machine. *Mol. Cell* 12, 75-86.
 25. Levchenko, I., Grant, R. A., Wah, D. A., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2003) Structure of a delivery protein for an AAA+ protease in complex with a peptide degradation tag. *Mol. Cell* 12, 365-372.
 26. Wah, D. A., Levchenko, I., Rieckhof, G. E., Bolon, D. N., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2003) Flexible linkers leash the substrate binding domain of SspB to a peptide module that stabilizes delivery complexes with the AAA+ ClpXP protease. *Mol. Cell* 12, 355-363.
 27. Wah, D. A., Levchenko, I., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2002) Characterization of a specificity factor for an AAA+ ATPase: Assembly of SspB dimers with ssrA-tagged proteins and the ClpX hexamer. *Chem. Biol.* 9, 1237-1245.
 28. Dougan, D. A., Weber-Ban, E. and Bukau, B. (2003) Targeted delivery of an ssrA-tagged substrate by the adaptor protein SspB to its cognate AAA+ protein ClpX. *Mol. Cell* 12, 373-380.
 29. Bolon, D. N., Wah, D. A., Hersch, G. L., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2004) Bivalent tethering of SspB to ClpXP is required for efficient substrate delivery: a protein-design study. *Mol. Cell* 13, 443-449.
 30. Bolon, D. N., Grant, R. A., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2004) Nucleotide-dependent substrate handoff from the SspB adaptor to the AAA+ ClpXP protease. *Mol. Cell* 16, 343-350.
 31. Gottesman, S. (1996) Proteases: and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 30, 465-506.
 32. Wang, J., Hartling, J. A. and Flanagan, J. M. (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91, 447-456.
 33. Kim, D. Y. and Kim, K. K. (2003) Crystal structure of ClpX molecular chaperone from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 278, 50664-50670.



34. Wojtyra, U. A., Thibault, G., Tuite, A. and Houry, W. A. (2003) The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function. *J. Biol. Chem.* 278, 48981-48990.
35. Donaldson, L. W., Wojtyra, U. A. and Houry, W. A. (2003) Solution structure of the dimeric zinc binding domain of the chaperone ClpX. *J. Biol. Chem.* 278, 48991-48996.
36. Williams, K. P. (2002) The tmRNA website: invasion by an intron. *Nucleic Acids Res.* 30, 171-182.
37. Keiler, K. C., Shapiro, L. and Williams, K. P. (2000) tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all known bacterial genomes: a two-piece tmRNA functions in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7778-7783.
38. McGinness, K. E. and Sauer, R. T. (2004) Ribosomal protein S1 binds mRNA and tmRNA similarly but plays distinct roles in translation of these molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13454-13459.
39. Flynn, J. M., Levchenko, I., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2004) Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes & Dev.* 18, 2292-2301.
40. Flynn, J. M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S. H., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2001) Overlapping recognition determinants within the ssrA degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10584-10589.
41. Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I. and Baker, T. A. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell* 11, 671-683.
42. Burton, R. E., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2005) Nucleotide-dependent substrate recognition by the AAA+ HslUV protease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 245-251.