

# Stanični odgovor bakterije *Escherichia coli* na pogreške u biosintezi proteina na izoleucinskim položajima

---

Pranjić, Marija

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:464649>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-06**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marija Pranjić

**STANIČNI ODGOVOR BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI* NA POGREŠKE U BIOSINTEZI PROTEINA  
NA IZOLEUCINSKIM POLOŽAJIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2024.





University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

Marija Pranjić

**CELLULAR RESPONSE TO PROTEOME-WIDE  
ISOLEUCINE MISTRANSLATION IN  
*ESCHERICHIA COLI***

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Zagreb, 2024.



## **Zahvale**

Hvala mentoru doc. dr. sc. Marku Močibobu na vodstvu i brojnim diskusijama koje su doprinijele interpretaciji eksperimenata i kvaliteti ove disertacije.

Hvala prof. dr. sc. Iti Gruić-Sovulj na osmišljavanju tematike ove disertacije i pružanju mogućnosti za boravak u inozemstvu koja me upoznala s novom tehnikom i proširila moje znanstvene vidike.

Hvala svim sadašnjim i bivšim članovima Zavoda za biokemiju na znanstvenim diskusijama i moralnoj potpori koju ste mi pružali, a posebno Valentini, Aleksandri, Vladi i Ani.

Hvala svim suradnicima iz Tübingena, prof. Borisu Mačeku, Maji i Philippu, na uvođenju u svijet spektrometrije masa.

Hvala noni i didi, baki i dedi što ste uskakali u mnogobrojnim situacijama kad je Mihael bio bolestan i kad sam išla na razna usavršavanja.

Hvala dragim prijateljima, Maji i Teonu, što godinama slušate moje jadikovke oko ovog doktorata.

Hvala dragom Mihi jer činiš moje srce radosnim, a život ljepšim i zabavnijim.

I na kraju, hvala tebi moja Ljubavi što je život s tobom jednako skladan bilo sunce ili kiša.  
Hvala što me podržavaš i čvrsto vjeruješ u moj znanstveni potencijal.



## Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Cilj i hipoteze rada .....</b>	<b>3</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Uzroci pogrešaka u biosintezi proteina .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze osiguravaju točnost biosinteze proteina .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze .....	8
2.2.1.1. Supstrati aminoacil-tRNA-sintetaza .....	10
2.2.1.2. Mehanizmi popravka pogreške.....	11
2.2.2. Izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.2.2.1. Nepripadni supstrati izoleucil-tRNA-sintetaze .....	15
<b>2.3. Efekti pogrešaka u staničnoj biosintezi proteina.....</b>	<b>17</b>
2.3.1. Povezanost mistranslacije s različitim patološkim stanjima .....	17
2.3.2. Pozitivne posljedice mistranslacije .....	21
2.3.3. Razina mistranslacije mijenja se s fazom rasta bakterija .....	25
<b>2.4. Proteomika i globalna analiza pogrešaka u biosintezi proteina.....</b>	<b>27</b>
2.4.1. Proteomika temeljena na spektrometriji masa .....	27
2.4.2. Priprema uzorka za analizu proteomikom odozdo-nagore .....	27
2.4.3. Analiza smjese peptida LC-MS/MS metodom.....	29
2.4.4. Identifikacija proteina spektrometrijom masa.....	32
2.4.5. Kvantitativna proteomika .....	33
2.4.6. Primjena spektrometrije masa u detekciji supstitucije aminokiselina.....	35
<b>2.5. Šaperonski sustavi u bakteriji <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>36</b>
2.5.1. Uloga šaperona u ispravnom smatanju proteina .....	36
2.5.2. Šaperonski sustav DnaK/DnaJ/GrpE.....	36
2.5.3. Utjecaj mistranslacije na regulaciju ekspresije šaperona .....	38
<b>§ 3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>39</b>
3.1.1. Standardne krute kemikalije .....	39
3.1.2. Standardne tekuće kemikalije .....	39
3.1.3. Antibiotici .....	40



3.1.4. Aminokiseline i nukleotidi .....	40
3.1.5. Organske boje.....	40
3.1.6. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline .....	40
3.1.7. Materijal za kromatografiju .....	40
3.1.8. Elektroforetski standardi.....	40
3.1.9. Kemikalije za pripremu otapala za spektrometriju masa.....	40
3.1.10. Izotopni reagensi za izotopno obilježavanje peptida na čvrstoj fazi.....	41
3.1.11. Komercijalni kompleti .....	41
3.1.12. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije <i>E. coli</i> .....	41
3.1.12.1. Tekući i kruti hranjivi mediji.....	41
3.1.13. Sojevi bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	42
3.1.14. Bakteriofag P1 za transdukciju.....	42
3.1.15. Plazmidi za transformaciju bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.1.16. Standardne kemikalije za lančanu reakciju polimerazom.....	43
3.1.17. Početnice za lančanu reakciju polimerazom.....	43
<b>3.2. Konstrukcija sojeva bakterije <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>44</b>
3.2.1. Opis pripreme sojeva.....	44
3.2.2. Priprema bakteriofaga P1 i transdukcija.....	46
3.2.2.1. Priprema bakteriofaga P1 za transdukciju .....	46
3.2.2.2. Transdukcija bakteriofagom P1 .....	46
3.2.3. FRT-FLP mjesno-specifična rekombinacija.....	47
3.2.4. Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	47
3.2.5. Transformacija stanica plazmidom pCP20.....	48
3.2.6. Testiranje auksotrofije dobivenih sojeva na M9 pločama.....	48
3.2.7. Izolacija genomske DNA .....	49
3.2.8. Lančana reakcija polimerazom .....	50
3.2.9. Sekvenciranje.....	51
3.2.10. Agarozna gel elektroforeza .....	51
3.2.11. Mjerenje krivulja rasta auksotrofnih sojeva <i>E. coli</i> .....	52
<b>3.3. Istraživanje toksičnosti mistranslacije <i>in vivo</i> .....</b>	<b>53</b>
3.3.1. Mjerenje krivulja rasta bakterija.....	53
3.3.2. Određivanje razine mistranslacije u M9* mediju s različitim koncentracijama neprirodnih aminokiselina .....	53
3.3.3. Utjecaj mistranslacije na staničnu morfologiju .....	53
3.3.4. Test preživljavanja stanica na hranjivim pločama uz simultani mistranslacijski i toplinski stres .....	54

3.3.5. Test utjecaja mistranslacije na maksimalnu temperaturu preživljavanja .....	54
3.3.6. Test vremenskog preživljavanja bakterija pri 50 °C .....	54
<b>3.4. Izolacija staničnih ekstrakata i interaktora DnaK.....</b>	<b>55</b>
3.4.1. Uzgoj bakterija i izolacija proteina u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta .....	55
3.4.2. Uzgoj bakterija i izolacija DnaK interaktora u eksponencijalnoj fazi rasta.....	55
3.4.3. Analiza sastava proteina poliakrilamidnom elektroforezom s dodatkom natrijeva dodecilsulfata .....	56
<b>3.5. Priprema uzoraka za analizu spektrometrijom masa.....</b>	<b>58</b>
3.5.1. Izolacija proteina taloženjem pomoću metanola i kloroforma.....	58
3.5.2. Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu .....	58
3.5.3. Razgradnja proteina tripsinom .....	58
3.5.4. Priprema i odsoljavanje peptida na C18 materijalu.....	59
3.5.5. Izotopno obilježavanje peptida na čvrstoj fazi .....	59
3.5.6. Provjera efikasnosti izotopnog obilježavanja peptida na čvrstoj fazi .....	60
3.5.7. Postavke uređaja tijekom analize uzoraka spektrometrijom masa .....	61
3.5.8. Procesiranje i obrada podataka dobivenih LC-MS/MS analizom.....	62
3.5.8.1. Procesiranje i analiza proteomskih podataka .....	62
3.5.8.2. Procesiranje i analiza izoliranih interaktora DnaK .....	63
3.5.9. Analiza pripadnosti skupine proteina pojedinoj funkciji u stanici .....	64
3.5.10. Javna dostupnost podataka .....	64
<b>3.6. Analiza mistranslacije u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi u bakterijama .....</b>	<b>65</b>
<b>§ 4. REZULTATI.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1. Dodatak norvalina smanjuje unos aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom u stanicu .....</b>	<b>67</b>
4.1.1. Konstrukcija auksotrofnih sojeva bakterije <i>Escherichia coli</i> za aminokiseline s razgranatim bočnim ogrankom.....	67
4.1.2. Norvalin je toksičan za soj bakterije <i>E. coli</i> auksotrofan za aminokiseline s razgranatim bočnim ogrankom .....	71
4.1.3. Dodatak norvalina utječe na transport aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom.....	72
<b>4.2. Istraživanje toksičnosti mistranslacije <i>in vivo</i> .....</b>	<b>74</b>
4.2.1. Karakterizacija soja bez popravka pogreške poslije prijenosa u izoleucil-tRNA-sintetazi u različitim uvjetima rasta .....	74
4.2.2. Mistranslacija mijenja morfologiju stanica .....	78
4.2.3. Mistranslacija smanjuje preživljavanje stanica uslijed temperaturnog stresa .....	80
<b>4.3. Proteomski odgovor na mistranslaciju.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4. Utjecaj mistranslacije na šaperonske interaktore .....</b>	<b>88</b>
4.4.1. Izolacija interaktora proteina DnaK.....	88

---

4.4.2. Optimizacija postupka izolacije interaktora šaperona DnaK.....	89
4.4.3. Izolacija šaperona DnaK u uvjetima toplinskog stresa i mistranslacije.....	93
4.4.3.1. Usporedba interaktora DnaK s proteomom.....	95
<b>4.5. Stanični odgovor na mistranslaciju u stacionarnoj fazi rasta .....</b>	<b>96</b>
4.5.1. Mistranslacija inducira SOS-odgovor i generalni odgovor na stres .....	96
4.5.2. Mistranslacija u stacionarnoj fazi rasta divljeg tipa bakterije <i>Escherichia coli</i> i usporedba s ostalim organizmima.....	97
<b>§ 5. RASPRAVA .....</b>	<b>101</b>
<b>5.1. Dodatak norvalina smanjuje unos aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom u stanicu .....</b>	<b>101</b>
<b>5.2. Stanični odgovor na pogreške u biosintezi proteina na izoleucinskim položajima .....</b>	<b>103</b>
<b>5.3. Izoleucinska mistranslacija destabilizira proteine koji sudjeluju u translacijskim procesima .....</b>	<b>106</b>
<b>5.4. Mistranslacija aktivira SOS-odgovor .....</b>	<b>108</b>
<b>§ 6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>111</b>
<b>§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....</b>	<b>113</b>
<b>§ 8. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>117</b>
<b>§ 9. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XVIII</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### STANIČNI ODGOVOR BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI* NA POGREŠKE U BIOSINTEZI PROTEINA NA IZOLEUCINSKIM POLOŽAJIMA

Marija Pranjić

Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Istražen je stanični odgovor bakterije *Escherichia coli* na pogreške u biosintezi proteina na izoleucinskim položajima (mistranslacija) metodama klasične mikrobiologije i kvantitativne proteomike uz uporabu spektrometra masa visoke rezolucije. Uspoređena je toksičnost kanonske i nekanonske mistranslacije, odnosno zamjene izoleucina proteinogenim valinom i zamjene izoleucina neproteinogenim norvalinom.

Pokazano je da *Escherichia coli* može podnijeti vrlo visoku razinu mistranslacije (do 20 %). Rast u nutritivno siromašnim uvjetima uz dodatak norvalina ili valina uzrokuje značajnu mistranslaciju na izoleucinskim pozicijama u divljem tipu bakterije. Mistranslacija inhibira stanični rast, smanjuje otpornost stanice na toplinski stres te izaziva SOS-odgovor i filamentaciju stanica u stacionarnoj fazi rasta. Izoleucinska mistranslacija pojačava ekspresiju glavnih proteaza i šaperonskih sustava. Uslijed mistranslacije mijenjaju se i interaktori glavnog bakterijskog šaperona DnaK koji su ukazali na preferentnu destabilizaciju proteina uključenih u proces translacije u stanici. Nekanonska mistranslacija mijenja ekspresiju većeg broja proteina i izaziva veći inhibitory učinak na rast stanica od kanonske mistranslacije.

(123 + XIX stranica, 61 slika, 12 + III tablica, 174 literaturnih navoda,  
jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: izoleucil-tRNA-sintetaza/ mistranslacija/ norvalin/ spektrometrija masa/ valin

Mentor: doc. dr. sc. Marko Močibob

Rad prihvaćen: 8. svibnja 2024.

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće,
2. Prof. dr. sc. Branimir Bertoša,
3. Doc. dr. sc. Anita Horvatić





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### CELLULAR RESPONSE TO PROTEOME-WIDE ISOLEUCINE MISTRANSLATION IN *ESCHERICHIA COLI*

Marija Pranjic

Faculty of Science, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

The cellular response of *Escherichia coli* to errors in protein biosynthesis at isoleucine positions (mistranslation) was investigated using classical microbiological methods and mass-spectrometry-based quantitative proteomics. The toxicity of canonical and non-canonical mistranslation was compared, e.g. the substitution of isoleucine with proteinogenic valine and the substitution of isoleucine with non-proteinogenic norvaline.

*Escherichia coli* can tolerate very high levels of isoleucine mistranslation (up to 20%). Growth in nutritionally poor conditions with the addition of norvaline or valine causes significant isoleucine mistranslation in wild-type bacteria. Mistranslation inhibits cellular growth, reduces the cell's resilience to heat stress and causes the SOS response and filamentation in the stationary phase. Isoleucine mistranslation causes upregulation of major proteases and chaperone systems. The interactors of the main bacterial chaperone DnaK change during mistranslating conditions indicating preferential destabilization of proteins involved in translational processes. Non-canonical mistranslation causes higher proteome dysregulation and a higher inhibitory effect on cellular growth than canonical mistranslation.

(123 + XIX pages, 61 figures, 12 + III tables, 174 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: isoleucyl-tRNA synthetase/ mass spectrometry/ mistranslation/ norvaline/ valine

Supervisor: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Thesis accepted: 8 May 2024

Reviewers:

1. Dr. Ivana Ivančić Baće, Professor
2. Dr. Branimir Bertoša, Professor
3. Dr. Anita Horvatić, Assistant Professor



## § 1. UVOD

Translacija je završni od triju fundamentalnih staničnih procesa koji omogućavaju prijenos genetičke informacije od DNA do proteina. Dva procesa najviše utječu na točnost biosinteze proteina: sparivanje tRNA i odgovarajuće aminokiseline, te prepoznavanje nastale aminoacil-tRNA na ribosomu gdje se aminokiselina ugrađuje u rastući polipeptidni lanac [1]. Pogreške u navedenim procesima najčešći su uzrok mistranslacije – pogrešne ugradnje aminokiseline u proteom stanice. Ovisno o tipu nastanka, mistranslacija se može dogoditi lokalno – supstitucijom aminokiseline kodirane specifičnim kodonom uslijed pogreške na ribosomu, regionalno – supstitucijom specifične aminokiseline uslijed pogreške odgovarajuće aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) i globalno – neselektivnim ugrađivanjem pojedine aminokiseline u proteom stanice [2]. Točnost mistranslacije u bakteriji *Escherichia coli* prosječno iznosi oko  $10^{-3}$ , no dodatno varira za red veličine ovisno o vrsti kodona, poziciji kodona/aminokiseline u proteinu i fiziološkim uvjetima u stanici [1].

AaRS su enzimi koji u dva koraka kataliziraju reakciju esterifikacije aminokiseline i tRNA s odgovarajućim antikodonom [3]. Prema tome, aaRS su odgovorne za prevođenje genetičkog koda. U stanici postoji 20-ak različitih aaRS, u pravilu po jedna za svaku proteinogenu aminokiselinu [3]. Kako bi osigurale nastanak ispravnog produkta, ovi enzimi moraju specifično prepoznavati aminokiselinu i tRNA. Zahvaljujući svojoj veličini, molekula tRNA ostvaruje interakciju s aaRS duž nekoliko elemenata identiteta koji se uglavnom nalaze na antikodonu i akceptorskoj peteljci [4]. Aminokiselina je u usporedbi s tRNA puno manji supstrat, zbog čega aktivno mjesto aaRS teže diskriminira aminokiseline strukturno slične pripadnom supstratu. Kako bi osigurale potrebnu točnost translacije, 10 vrsta aaRS sadrži dodatnu domenu za popravak pogreške koja katalizira hidrolizu estera nepripadne aminokiseline i tRNA [3].

AaRS se dijele u dva razreda koje se razlikuju prema evolucijskoj prošlosti, strukturnim karakteristikama i mehanizmu reakcije [3]. U fokusu ove doktorske disertacije nalazi se izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) iz bakterije *E. coli*. IleRS je enzim razreda I, evolucijski sličan leucil-tRNA-sintetazi (LeuRS) i valil-tRNA-sintetazi (ValRS) [3]. Sve tri aaRS imaju zasebnu domenu za popravak pogreške umetnutu unutar katalitičke domene. Sve poznate sekvence IleRS imaju sačuvanu domenu za popravak pogreške [5], za razliku od primjerice srodne LeuRS



kod koje postoje sekvence iz bakterija roda *Mycoplasma* koje sadrže mutacije na pozicijama ključnim za katalitičku aktivnost domene za popravak pogreške ili čak delecijom cijele domene [6]. Navedeno ukazuje na važnost ispravne ugradnje izoleucina na odgovarajuća mjesta u proteomu u svim domenama života. Domena za popravak pogreške IleRS iz *E. coli* ne katalizira hidrolizu pripadnog produkta (Ile-tRNA<sup>Ile</sup>), ali katalizira hidrolizu vrlo širokog spektra nepripadnih produkata [7].

IleRS iz *E. coli* ima dva supstrata strukturno slična izoleucinu koji se posebno dobro prepoznaju u aktivnom mjestu enzima: valin i norvalin [8]. Obje aminokiseline mogu se prirodno naći u bakteriji *E. coli*. Valin je jedan od najzastupljenijih metabolita u bakteriji *E. coli* čija koncentracija iznosi čak 4 mmol/L [9], dok je norvalin nusprodukt sinteze leucina koji nastaje u mikroaerobnim uvjetima [10, 11]. Ove dvije aminokiseline strukturni su izomeri koji u usporedbi s izoleucinom imaju jednu metilensku skupinu manje. Izoleucin i valin su  $\beta$ -razgranate aminokiseline koje imaju visoku sklonost gradnji  $\beta$ -ploča [12, 13], dok norvalin s linearnim bočnim ogrankom ima sklonost tvorbi  $\alpha$ -zavojnica [13, 14]. Ugradnja norvalina umjesto izoleucina pokazala se toksičnijom od ugradnje valina [8], a potencijalni uzrok toksičnosti mogla bi biti narušena struktura  $\beta$ -ploča [13]. Proteini s narušenom strukturom imaju izloženije hidrofobne aminokiseline, skloniji su agregaciji i tijekom smatanja više ovise o šaperonima [15]. Osim toga, mistranslatirani proteini mogu biti hidrolizirani staničnim proteazama [16].

Mistranslatirani proteini imaju narušenu strukturu i trebaju pomoć šaperona pri smatanju. U bakteriji *E. coli* postoji nekoliko šaperonskih sustava: DnaK/DnaJ/GrpE, GroES/EL, HtpG i ClpB [15]. DnaK/DnaJ/GrpE je središnji šaperonski sustav u kojemu glavnu ulogu ima DnaK [17] – protein koji se sastoji od dvije domene. N-terminalna domena veže i hidrolizira ATP i na taj način regulira vezanje ili otpuštanje krivo smotanog proteina u C-terminalnoj domeni [18]. Prema tome, DnaK može postojati u otvorenoj ili zatvorenoj konformaciji, ovisno o tome ima li vezan ATP ili ADP. Izolacijom i analizom interaktora DnaK spektrometrijom masa, Calloni i suradnici su pokazali da od svih šaperona DnaK ima najveći broj interaktora (preko 600) s vrlo širokim rasponom funkcija u stanici [17]. Utjecaj mistranslacije na interaktore šaperona dosad još nije istražen.

## 1.1. Cilj i hipoteze rada

Mistranslacija je obrađena u mnogobrojnim istraživanjima [1, 8, 11, 19–25], međutim u fokusu takvih istraživanja u pravilu je istraživanje fenotipskih promjena koje mistranslacija izaziva. Relativno je malo proteomskih istraživanja koji daju uvid u globalnu razinu mistranslacije u stanici [1, 8, 11] ili uvid u regulaciju ekspresije proteina u stanici [25, 26]. Osim toga, nijedna od navedenih proteomskih analiza nije uključivala usporedbu kanonske i nekanonske mistranslacije, tj. zamjene pojedine aminokiseline u proteomu stanice proteinogenom odnosno neproteinogenom aminokiselinom. Pretragom literature nije nađeno ni jedno istraživanje koje u obzir uzima promjene u interaktorima šaperona ili vrsti proteina koji agregiraju, pružajući na taj način uvid u to koji tip proteina najčešće treba pomoć u ostvarivanju funkcionalne 3D strukture.

Cilj ovog istraživanja je odrediti stanični odgovor bakterije *E. coli* na supstituciju izoleucina norvalinom, odnosno valinom u proteomu. Specifični ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Konstruirati soj bakterije *E. coli* koji je auksotrof za izoleucin, norvalin i valin i deaktivirati domenu za popravak pogreške IleRS uvođenjem mutacija T243R/D342A koje inaktiviraju njezinu hidrolitičku aktivnost i omogućuju ugradnju norvalina ili valina na izoleucinske pozicije u proteomu stanice.
2. Odrediti na koji način ugradnja norvalina i valina na izoleucinske pozicije u proteomu konstruiranog soja utječe na njegov rast, morfologiju i preživljavanje.
3. Odrediti omogućava li mistranslacija prilagodbu bakterije na toplinski stres.
4. Odrediti razinu mistranslacije konstruiranog soja u različitim fazama rasta i identificirati biološke procese na koje mistranslacija najviše utječe.
5. Izolirati i identificirati interaktore šaperona DnaK u mistranslatirajućim uvjetima te odrediti tip proteina koji je najosjetljiviji na mistranslaciju.

U ostvarivanju prvog cilja korištene su metode genetičkog inženjerstva bakterije *Escherichia coli*: transdukcija bakteriofagom P1 [27] i FRT-FLP mjesno-specifična rekombinacija [28]. U ostvarivanju drugog i trećeg cilja korištene su različite mikrobiološke metode kao što su mjerenja krivulja rasta bakterije u različitim uvjetima, određivanje koncentracije valina odnosno norvalina u tekućem mediju pri kojoj je postignuta 50 %-tna inhibicija rasta bakterija ( $IC_{50}$  vrijednost), mikroskopiranje i preživljavanje bakterija na različitim hranjivim podlogama.

U ostvarivanju četvrtog i petog cilja korištena je kvantitativna spektrometrija masa. Interaktori šaperona DnaK izolirani su uporabom afinitetne kromatografije (engl. *pull-down assay*) [17].

Hipoteze ovog istraživanja su:

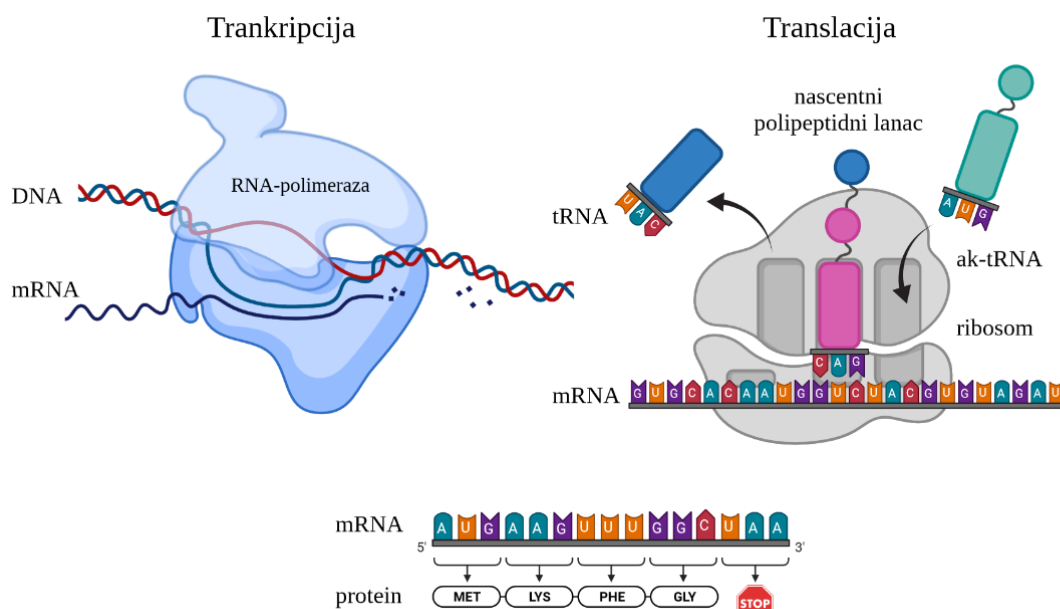
- Supstitucija izoleucina u proteomu bakterije *Escherichia coli* narušava tercijarnu strukturu proteina i povećava broj šaperonskih interaktora.
- Mistranslacija neproteinogenom aminokiselinom (norvalinom) ima toksičniji efekt i izaziva veće strukturne promjene u proteinima u odnosu na mistranslaciju proteinogenom aminokiselinom (valinom).

Očekivani znanstveni doprinos ove disertacije je dobiti detaljniji uvid u važnost pravilne ugradnje izoleucina u proteine koja se očituje postojanjem domene za popravak pogreške u izoleucil-tRNA-sintetazama iz svih domena života, objasniti razliku u toksičnosti ugradnje neproteinogenog norvalina od ugradnje proteinogenog valina na izoleucinske pozicije u proteomu bakterije *E. coli* i povezati opažene promjene s razinom pojedine vrste mistranslacije u stanici.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Uzroci pogrešaka u biosintezi proteina

Sve žive stanice sadrže DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina) koja je nositelj genetičke informacije jer sadrži informaciju o slijedu aminokiselina u proteinima [29]. DNA se sastoji od dva međusobno komplementarna lanca od kojih je svaki lanac polimer koji se sastoji od četiriju deoksiribonukleotida (deoksiadenilata, deoksigvanilata, deoksicitidilata i deoksitimidilata) povezanih fosfodieterskim vezama. U stanici postoji nekoliko različitih procesa koji omogućavaju prijenos genetičke informacije od DNA do proteina: replikacija DNA, transkripcija i translacija (slika 1).



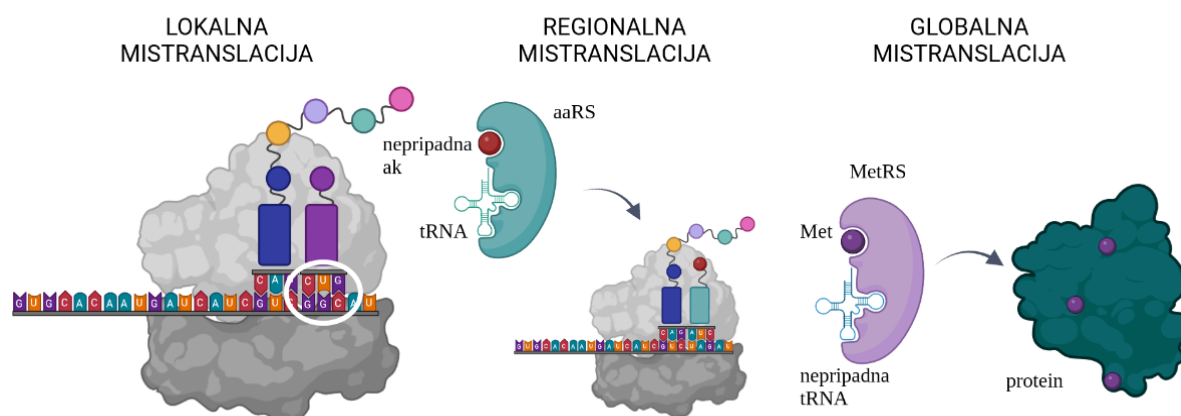
**Slika 1. Shema prijenosa genetičke informacije od DNA do proteina.** RNA-polimeraza prevodi slijed nukleotida u DNA u slijed nukleotida u molekuli mRNA procesom koji se naziva transkripcija. Nastala mRNA veže se na malu podjedinicu ribosoma gdje se sljedovi tripleta nukleotida prevode u slijed aminokiselina u proteinu. Shema je napravljena uz pomoć stranice [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

Replikacija DNA omogućava ispravan prijenos genetičkog materijala tijekom diobe stanice, transkripcija prepisivanje nukleotida DNA u mRNA (engl. *messenger ribonucleic acid*, glasnička ribonukleinska kiselina), a translacija prevođenje nukleotida u molekuli mRNA u slijed aminokiselina u proteinu. Ukoliko slijed aminokiselina u proteinu u potpunosti ne odgovara kodirajućem slijedu u molekuli DNA, došlo je do pogreške u jednom od navedenih procesa. U stanici postoje raznoliki mehanizmi koji sprječavaju nastanak takvih pogrešaka.

Replikacija DNA jedan je od najtočnijih procesa u stanici jer osigurava ispravan prijenos genetičkog materijala tijekom diobe stanice. Frekvencija greške replikacije DNA u bakteriji *Escherichia coli* iznosi oko  $10^{-9}$  po paru nukleotida po generaciji [30]. Ukoliko se greška i dogodi, moguće je da neće rezultirati promjenom u slijedu aminokiselina u proteinu zbog degeneracije genetičkog koda. Transkripcija DNA u mRNA manje je točan proces koji katalizira RNA-polimeraza (slika 1) s frekvencijom greške koja u *E. coli* iznosi između  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$  po nukleotidu [31]. Nastala molekula mRNA na ribosomu se translata u protein (slika 1). Procjenjuje se da sintetizirani proteini imaju frekvenciju pogreške  $10^{-3}$  po aminokiselini [1]. Kao supstrat za ugradnju aminokiseline u rastući polipeptidni lanac koriste se molekule aminoacil-tRNA (slika 1) čiji nastanak kataliziraju aminoacil-tRNA-sintetaze [3]. Nakon sinteze, aminoacil-tRNA formira ternarni kompleks s proteinom EF-Tu na koji je vezan GTP [32]. Ternarni kompleks dolazi do ribosoma gdje se veže na A-mjesto nastankom interakcije između triju antikodonskih baza u molekuli tRNA i triju kodonskih baza u molekuli mRNA. EF-Tu može prepoznati neispravnu molekulu aminoacil-tRNA i onemogućiti njezino sudjelovanje u translaciji [33]. U suprotnom, ternarni kompleks dolazi do ribosoma gdje nastanak ispravne interakcije između kodona i antikodona osigurava ugradnju ispravne aminokiseline u rastući polipeptidni lanac. Ukoliko se u rastući polipeptidni lanac ugradi neprikladna aminokiselina još uvijek je moguće da će dodatni mehanizam provjere pogreške na ribosomu dovesti do disocijacije krnjeg polipeptidnog lanca [32]. Krnji protein u citoplazmi stanice može hidrolizirati čime se sprječavaju neželjeni efekti koje bi netočno sintetizirani protein mogao izazvati u stanici.

Pogrešna biosinteza proteina često se naziva mistranslacija prema translaciji kao najmanje točnom procesu u prijenosu genetičke informacije od DNA do proteina. Mistranslacija se, s obzirom na mjesto nastanka i utjecaj na stanicu, može klasificirati u tri kategorije: lokalnu, regionalnu i globalnu (slika 2) [2]. Lokalna mistranslacija naziv je za zamjenu specifične aminokiseline kodirane točno određenim kodonom u proteomu stanice (npr. zamjena tirozina kodiranog UAC kodonom u histidin [34]). Lokalna mistranslacija uzrokovana je pogreškama u ostvarivanju interakcije kodona i antikodona na ribosomu [34]. Regionalna mistranslacija naziv je za zamjenu jedne aminokiseline drugom, obično strukturno sličnom (npr. zamjena izoleucina valinom koji sadrži jednu metilensku (-CH<sub>2</sub>-) skupinu manje [8, 25]) i uzrokovana je pogreškom odgovarajuće aminoacil-tRNA-sintetaze. Globalna mistranslacija nespecifična je ugradnja jedne ili više različitih aminokiselina na različita mjesta u proteomu.

Primjer globalne mistranslacije je nespecifična ugradnja metionina u proteom stanice [35]. Ona je u ljudskim stanicama uzrokovana fosforilacijom dvaju serinskih bočnih ogranka metionil-tRNA-sintetaze (MetRS) koji smanjuju njezin afinitet prema tRNA<sup>Met</sup>, a povećavaju prema neprikladnim molekulama tRNA [36]. Takva nespecifična metionilacija proteoma mehanizam je obrane stanice od oksidativnog stresa [35].



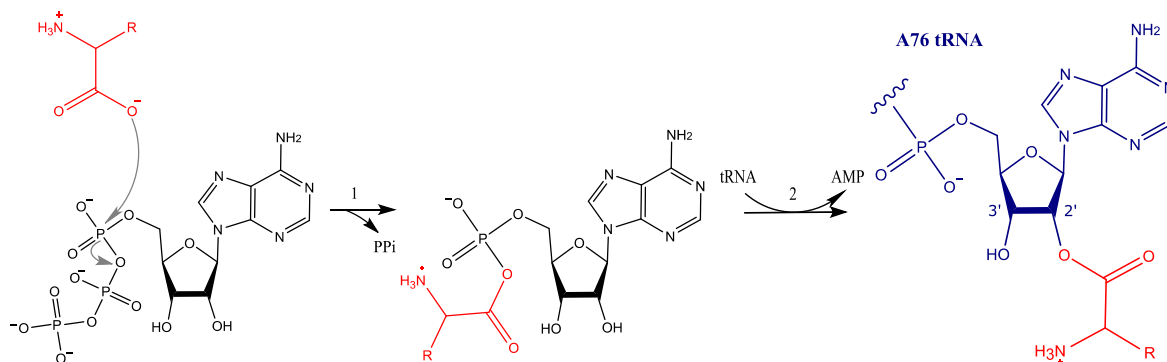
**Slika 2. Vrste mistranslacije prema mjestu nastanka i utjecaju na stanicu.** Lokalna mistranslacija uzrokovana je netočnom interakcijom između kodona i antikodona na ribosomu. Regionalna mistranslacija uzrokovana je pogrešnim sparivanjem tRNA i neprikladne aminokiseline koje katalizira aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Globalna mistranslacija nespecifična je ugradnja pojedine aminokiseline ili više njih na nespecifična mjesta u proteomu. Ovdje je prikazana na primjeru nespecifičnog ugrađivanja metionina (Met) u proteine uslijed sparivanja s neprikladnim molekulama tRNA koje katalizira metionil-tRNA-sintetaza (MetRS). Shema je napravljena uz pomoć stranice [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

Globalna analiza mistranslacije u bakteriji *E. coli* pokazala je da se većina (64 %) pogrešaka u biosintezi proteina događa na ribosomu, dok je u ostalih 36 % slučajeva uzrok pogreška u radu aminoacil-tRNA-sintetaza [1].

## 2.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze osiguravaju točnost biosinteze proteina

### 2.2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju reakciju esterifikacije između  $\alpha$ -karboksilne skupine aminokiseline i hidroksilne skupine na 3'-kraju molekule tRNA (slika 3). Svaka aaRS ima tri supstrata: aminokiselinu, tRNA i ATP. Reakcija esterifikacije odvija se u dva koraka. U prvom koraku dolazi do aktivacije aminokiseline u reakciji s  $\alpha$ -fosforinim atomom ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (slika 3). U drugom koraku aktivirani oblik aminokiseline reagira s hidroksilnom skupinom baze A76 koja se nalazi na 3'-kraju molekule tRNA pri čemu nastaje aminoacil-tRNA (slika 3) [3]. Oba koraka odvijaju se u sintetskom aktivnom mjestu aaRS.



**Slika 3. Mehanizam nastanka aminoacil-tRNA u reakciji kataliziranoj aminoacil-tRNA-sintetazom (aaRS) razreda I.** U prvom koraku nastaje aktivirani međuprodukt aminoacil-adenilat koji u drugom koraku reagira s 2'-OH skupinom na 3'-kraju molekule tRNA (baza A76). AaRS razreda II, uz iznimku fenilalanil-tRNA-sintetaze, kataliziraju analognu reakciju s 3'-OH skupinom tRNA (nije prikazano). Slika je napravljena u programima *ChemDraw Ultra 12.0* i *Inkscape*.

U pravilu, svaka od 20 aminokiselina kodiranih genetičkim kodom ima zasebnu aminoacil-tRNA-sintetazu i odgovarajuću tRNA ili set izoakceptorskih tRNA. AaRS se prema sličnosti u strukturnim motivima i evolucijskom podrijetlu mogu podijeliti u dva razreda, I i II (tablica 1) [3, 37].

Katalitička domena aaRS razreda I sadrži dva sačuvana motiva HIGH i KMSKS unutar Rossmanovog nabora koji se sastoji od pet paralelnih  $\beta$ -lanaca između kojih se nalaze  $\alpha$ -zavojnice (struktura  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ) [3, 4]. Rossmanov nabor vrlo je čest strukturni motiv koji se nalazi u proteinima koji vežu nukleotide (ATP, NAD<sup>+</sup>, FAD ili NADP<sup>+</sup>) [38]. Unutar Rossmanovog nabora u svim aaRS razreda I umetnuta je domena CP1 (skraćeno od engl. *connective peptide I*) koja u izoleucil-tRNA-sintetazi (IleRS), leucil-tRNA-sintetazi (LeuRS) i valil-tRNA-sintetazi (ValRS) ima ulogu domene za popravak pogreške. AaRS razreda I u pravilu su monomeri, a aaRS razreda II dimeri.

Katalitička domena aaRS razreda II sadrži  $\beta$ -ploču koja se sastoji od sedam antiparalelnih  $\beta$ -lanaca, a s jedne i druge strane  $\beta$ -ploče nalazi se po jedna  $\alpha$ -zavojnica [3]. Osim razlike u strukturi katalitičke domene, dva razreda se razlikuju i prema reakcijskom mehanizmu. AaRS razreda I aminoaciliraju molekulu tRNA na 2' hidroksilnoj skupini (slika 3), a razreda II na 3' hidroksilnoj skupini (uz jedinu iznimku: fenilalanil-tRNA-sintetazu) [37].

**Tablica 1. Klasifikacija aminoacil-tRNA-sintetaza u dva razreda.** Lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) može imati strukturu koja odgovara razredu I ili II, ovisno iz kojeg organizma je izolirana. Glicil-tRNA-sintetaza (GlyRS) može spadati u grupu II A ili II C, ovisno o organizmu iz kojeg je izolirana. Skraćenice neprirodnih aminokiselina su redom:  $\alpha$ -Abu –  $\alpha$ -aminobutanoat, Ala – alanin, Can – kanavanin, Cys – cistein, Gly – glicin,  $\delta$ hI –  $\delta$ -hidroksiizoleucin,  $\delta$ hL –  $\delta$ -hidroksileucin,  $\gamma$ hI –  $\gamma$ -hidroksiizoleucin,  $\gamma$ hL –  $\gamma$ -hidroksileucin, 4hP – 4-hidroksiprolin, Hcy – homocistein, Hse – homoserin, Ile – izoleucin, Met – metionin, nLeu – norleucin, Nva – norvalin, Orn – ornitin, Ser – serin, SerHO – serin hidroksamat, Thr – treonin, Tyr – tirozin, Val – valin. Tablica je preuzeta i prilagođena iz ref. [3] i [39].

Razred I				Razred II			
Podrazred	aaRS	Popravak pogreške	Neprirodni supstrati	Podrazred	aaRS	Popravak pogreške	Neprirodni supstrati
I A	IleRS	da	$\alpha$ -Abu, Cys, Hcy, Nva, Val	II A	GlyRS	ne	
	LeuRS	da	$\delta$ hI, $\delta$ hL, $\gamma$ hI, $\gamma$ hL, Ile, Met, nLeu, Nva, Val		HisRS	ne	
	MetRS	da	Hcy		ProRS	da	Ala, Cys, 4hP
	ValRS	da	$\alpha$ -Abu, Hcy, Thr,		SerRS	da	Cys, SerHO, Thr
I B	CysRS	ne		ThrRS	da	Ser	
	GlnRS	ne		II B	AsnRS	ne	
	GluRS	ne			AspRS	ne	
I C	TrpRS	ne		LysRS	da	Hcy, Hse, Orn	
	TyrRS	ne		AlaRS	da	Gly, Ser	
I D	ArgRS	da	Can	II C	GlyRS	ne	
I E	LysRS	ne		PheRS	da	Ile, Tyr	

Produkt reakcije koju katalizira aaRS – aminoacil-tRNA – supstrat je za sintezu proteina na ribosomu (slika 1). Svaka molekula tRNA u svojoj sekvenci sadrži specifični slijed od tri baze (antikodon). Antikodon molekule tRNA ostvaruje specifičnu interakciju s tripletom baza na

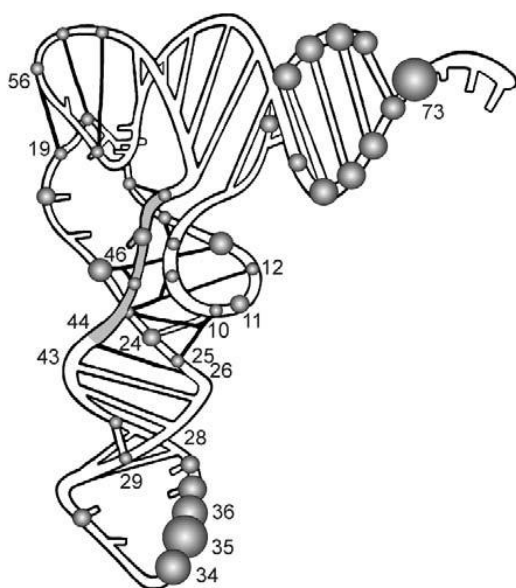


mRNA (kodonom) tijekom translacije na ribosomu i tako omogućuje ugradnju aminokiseline kodirane genetičkim kodom u rastući polipeptidni lanac. Prema tome, od esencijalne je važnosti za stanicu da aaRS prepozna specifičnu tRNA (ili set izoakceptorskih tRNA) i specifičnu aminokiselinu. U suprotnom, dolazi do nastanka esterske veze između nepripadne aminokiseline i tRNA što dovodi do pogrešaka u sintezi proteina.

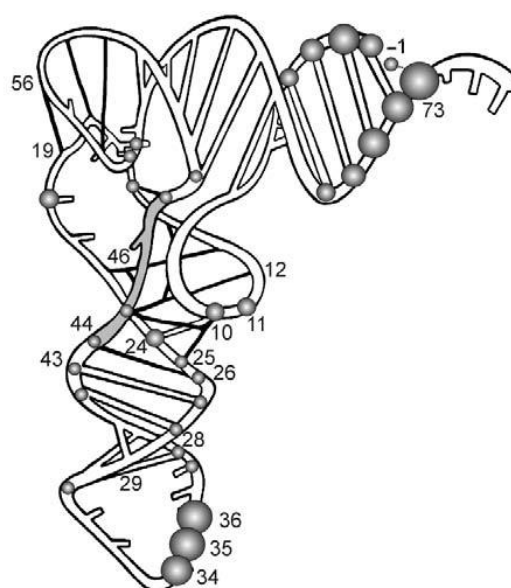
### 2.2.1.1. Supstrati aminoacil-tRNA-sintetaza

Molekula tRNA je polimer koji se uobičajeno sastoji od oko 76 ribonukleotida (adenilata, gvanilata, citidilata i uridilata) povezanih fosfodieterskim vezama [4]. U njezinoj strukturi nalaze se jednolančane i dvolančane regije (slika 4). Dvolančane regije dobile su zasebna imena: akceptorska peteljka (na kojoj se nalazi 3'-kraj molekule gdje se veže aminokiselina), D-ruka, T $\psi$ C-ruka i antikodonska ruka. Dodatno, neke molekule tRNA imaju i varijabilnu ruku. 3D struktura molekule tRNA zauzima oblik slova L (slika 4) gdje jedan kraj ostvaruje interakciju s mRNA, a drugi veže aminokiselinu.

A)



B)



**Slika 4. Elementi identiteta za aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I (A) i razreda II (B) prikazanih na modelu molekule tRNA<sup>Phe</sup>.** Veličina pojedine kugle na pojedinoj poziciji u molekuli tRNA je proporcionalna učestalosti pojedinog elementa identiteta unutar pojedinog razreda aminoacil-tRNA-sintetaza. Varijabilna ruka naznačena je sivom bojom i prepoznata je kao element identiteta kod tRNA<sup>Tyr</sup> gdje je, ovisno o organizmu, veća za do 13 nukleotida i kod tRNA<sup>Ser</sup> gdje je, ovisno o organizmu, veća za 16-21 nukleotid. Slika je preuzeta iz ref. [4].

Molekula tRNA je velika i ostvaruje velik broj interakcija s aaRS. Baze na molekuli tRNA koje ostvaruju interakcije s aaRS i osiguravaju specifičnost njihove interakcije nazivamo

elementima identiteta [4]. Elementi identiteta najčešće se nalaze na perifernim dijelovima molekule: antikodonu i akceptorskoj peteljci (slika 4) [4]. Mutacija baze tRNA koja je element identiteta uzrokuje gubitak specifičnosti aaRS prema odgovarajućoj tRNA. Osim mutacija na tRNA, postranslacijske modifikacije na odgovarajućoj aaRS mogu uzrokovati gubitak specifičnosti prema tRNA [36].

U usporedbi s tRNA, aminokiselina je puno manja molekula koja ostvaruje puno manje interakcija s aaRS. Osim 20 proteinogenih aminokiselina, u stanici se mogu naći i brojne druge neproteinogene aminokiseline koje nastaju kao metabolički međuprodukti (homocistein, homoserin, ornitin, citrulin), biljni produkti (kanavanin), produkti nastali oksidacijom proteinogenih aminokiselina (*m*-tirozin, hidroksiprolin) ili razgradnjom proteina koji sadrže različite postranslacijske modifikacije, nusprodukti biosinteze aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom (norvalin [10], norleucin) i različite D-aminokiseline koje se mogu naći u strukturi peptidoglikana [40]. Navedene aminokiseline predstavljaju prijetnju ostvarivanju točne biosinteze proteina.

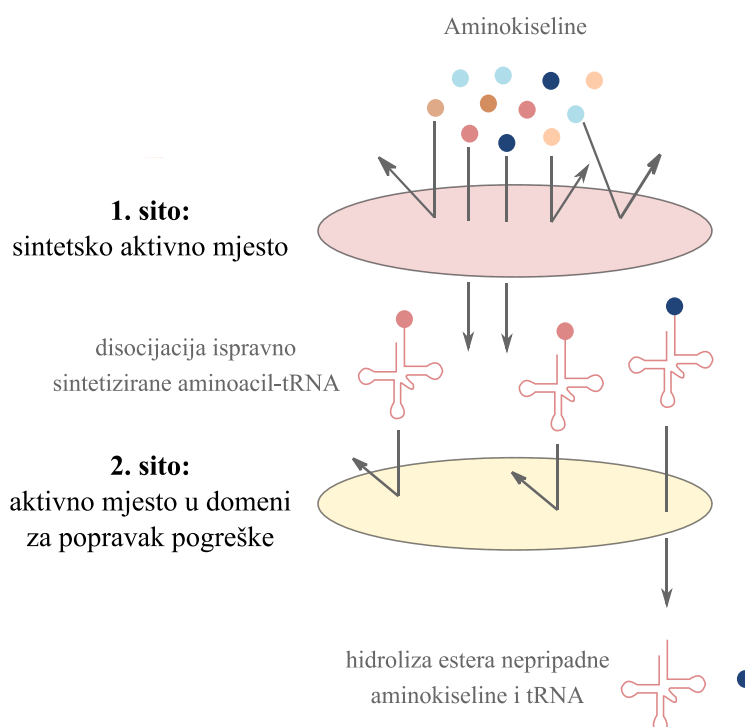
#### 2.2.1.2. *Mehanizmi popravka pogreške*

Raznolikost aminokiselina u stanici i ograničenost broja interakcija koje pripadna aminokiselina može ostvariti s enzimom, onemogućuje postizanje dovoljne razine točnosti (oko 1:1000 [1]) za neke vrste aaRS. Zbog toga su se razvili različiti mehanizmi popravka pogreške koji omogućuju hidrolizu aminoacil-adenilata ili aminoacil-tRNA (slika 5) [41]. Hidrolizu pogrešno aktivirane aminokiseline (aminoacil-adenilata) nazivamo popravkom pogreške prije prijenosa na tRNA, a hidrolizu pogrešno nastalog produkta (aminocil-tRNA) nazivamo popravkom pogreške nakon prijenosa na tRNA (slika 5). Popravak pogreške prije prijenosa događa se u sintetskom aktivnom mjestu aaRS ili u otopini. Ukoliko se događa u sintetskom aktivnom mjestu i za hidrolizu je nužno vezanje tRNA nazivamo ga popravkom pogreške ovisnim o tRNA. U suprotnom se naziva popravkom pogreške neovisnim o tRNA.

Popravak pogreške poslije prijenosa (slika 5) događa se u domeni za popravak pogreške na odgovarajućoj aaRS ili u aktivnom mjestu na zasebnom proteinu – trans-faktoru za popravak pogreške. Deset poznatih vrsta aaRS sadrži dodatnu domenu za popravak pogreške (tablica 1) [3]. AaRS razreda I sadrže domenu za popravak pogreške (domena CP1) umetnutu unutar Rossmanovog nabora, dok se enzimi razreda II razlikuju prema poziciji domene unutar enzima [3]. Ukoliko dođe do nastanka produkta između nepripadne aminokiseline i tRNA u sintetskom



sita Thr-tRNA<sup>Val</sup> ne bi trebao biti prepoznat u domeni za popravak pogreške valil-tRNA-sintetaze (ValRS). Unatoč tome, ValRS uspješno prepoznaje i hidrolizira Thr-tRNA<sup>Val</sup> [43]. Osim toga, nedavno je pokazano da aktivno mjesto u domeni za popravak pogreške IleRS razreda I uspješno prepoznaje pogrešno sintetizirane aminoacil-tRNA bez obzira na to je li nepripadna aminokiselina veća ili manja od pripadne te bez obzira na to aktivira li se u aktivnom mjestu [7]. Domena za popravak pogreške u IleRS evoluirala je tako da preko pojedinih aminokiselinskih bočnih ogranaka (His333, Thr 246) destabilizira prijelazno stanje koje formira pripadni produkt Ile-tRNA<sup>Ile</sup>, onemogućujući njegovu hidrolizu [7]. S druge strane, ostale pogrešno aminoacilirane tRNA<sup>Ile</sup> će moći hidrolizirati. Koncept povećanja energetske barijere prijelaznog stanja nekog supstrata, čime se onemogućuje njegova kataliza, nazivamo negativnom katalizom.



**Slika 6. Shematski prikaz mehanizma dvostrukog sita.** Aminokiseline veće od pripadne diskriminiraju se u aktivnom sintetskom mjestu aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS). Manje aminokiseline prenesu se na molekulu tRNA i hidroliziraju u aktivnom mjestu u domeni za popravak pogreške. Ispravno sintetizirana aminoacil-tRNA nije prepoznata u domeni za popravak pogreške. Slika je napravljena u programu *Inkscape*.

Osim domene za popravak pogreške, u stanici se mogu naći i zasebni proteini, trans-faktori za popravak pogreške koji hidroliziraju pogrešno sintetiziranu aminoacil-tRNA (slika 5) [3, 44]. Trans-faktori za popravak pogreške obično su homolozi domena za popravak pogreške različitih aaRS i nekad se nazivaju i „trećim sitom“ [3].

D-aminoacil-tRNA-deacilaza (DTD) je trans-faktor za popravak pogreške koji hidrolizira nekoliko različitih nepripadnih molekula D-aminoacil-tRNA u bakteriji *E. coli* i kvascu [45]. Ujedno pokazuje aktivnost i prema hidrolizi produkta s akiralnom aminokiselinom: glicil-tRNA<sup>Ala</sup> [46].

AlaX je ime za različite trans-faktore za popravak pogreške koji su homologni alanil-tRNA-sintetazi (AlaRS). AlaX su pronađeni u svim domenama života i hidroliziraju glicil-tRNA<sup>Ala</sup> i seril-tRNA<sup>Ala</sup> [47].

Poznato je nekoliko trans-faktora koji pripadaju INS superporodici proteina i hidroliziraju pogrešno nastale produkte nastale katalizom prolil-tRNA-sintetaze (ProRS) kao što su cisteinil-tRNA<sup>Pro</sup> [48], Ala-tRNA<sup>Pro</sup> i  $\alpha$ -aminobutiril-tRNA<sup>Pro</sup> [49].

Donedavno je prevladavalo mišljenje kako trans-faktori za popravak pogreške djeluju isključivo na nepripadne produkte aaRS razreda II [3]. Međutim, to je opovrgnuto nedavnim otkrićem kanavanil-tRNA<sup>Arg</sup>-deacilaze (CtdA) u bakteriji *Pseudomonas canavaninivorans* koja hidrolizira kanavanil-tRNA<sup>Arg</sup> (Can-tRNA<sup>Arg</sup>) – nepripadni produkt arginil-tRNA-sintetaze (ArgRS) iz razreda I [44].

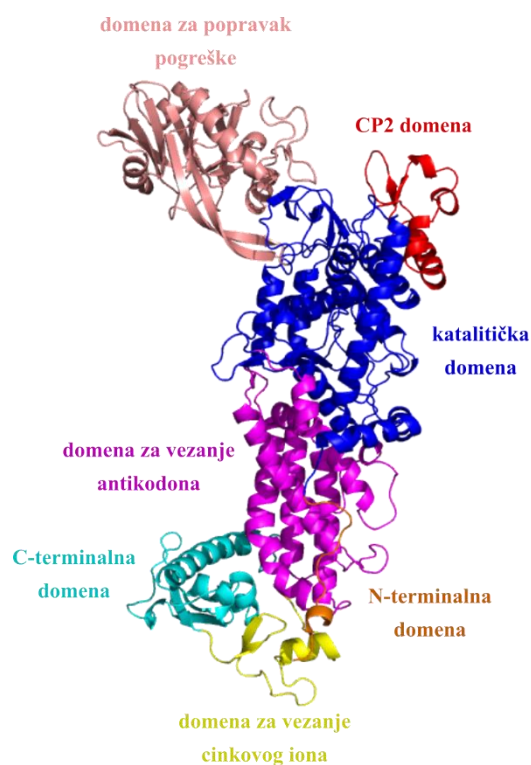
### 2.2.2. Isoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije *Escherichia coli*

Isoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je enzim koji katalizira reakciju esterifikacije izoleucina i tRNA<sup>Ile</sup>. U stanici postoje tri vrste tRNA<sup>Ile</sup> koje prepoznaju tri različita izoleucinska kodona na molekuli mRNA: AUU, AUA odnosno AUC. IleRS je esencijalan enzim, prisutan u sve tri domene života [5]. Prema evolucijskoj i strukturnoj sličnosti zajedno s ValRS, MetRS i LeuRS spada u grupu aaRS razreda IA (tablica 1).

Osobitost IleRS iz bakterije *E. coli* je uporaba dvaju mehanizama popravka pogreške: tRNA-ovisni popravak pogreške prije prijenosa [50] i popravak pogreške poslije prijenosa [42] (slika 5). Popravak pogreške prije prijenosa čini 30 % ukupnog popravka pogreške [51]. Struktura IleRS iz bakterije *E. coli* nije riješena, međutim može biti predviđena strukturnim modelom *AlphaFold* (slika 7). Na temelju njezine strukturne sličnosti s IleRS iz *Staphylococcus aureus* koja ima riješenu kristalnu strukturu (PDB kôd: 1FFY) [52] moguće joj je dodijeliti pojedine domene. Katalitička domena (slika 7, tamnoplavo) sadrži Rossmannov nabor i mjesto je aktivacije i aminoacilacije tRNA izoleucinom. Istovremeno, u katalitičkoj domeni odvija se popravak pogreške prije prijenosa [51]. Domena za vezanje antikodona molekule tRNA nalazi se ispod katalitičke domene (slika 7, ružičasto), a sastoji se većinom od  $\alpha$ -zavojnica. Domena

za popravak pogreške ili domena CP1 (slika 7, svijetloroza) i CP2 domena (slika 7, crveno) umetnute su u katalitičku domenu.

Domena za popravak pogreške očuvana je u svim poznatim IleRS [5] što dodatno upućuje na njezinu važnost. IleRS koristi mehanizam prepoznavanja i diskriminacije Ile-tRNA<sup>Ile</sup> produkta u domeni za popravak pogreške, dok hidrolizira široki raspon pogrešno sintetiziranih aminoacil-tRNA<sup>Ile</sup> produkata bez obzira na aktivaciju neprirodnih aminokiselina u aktivnom mjestu IleRS [7].



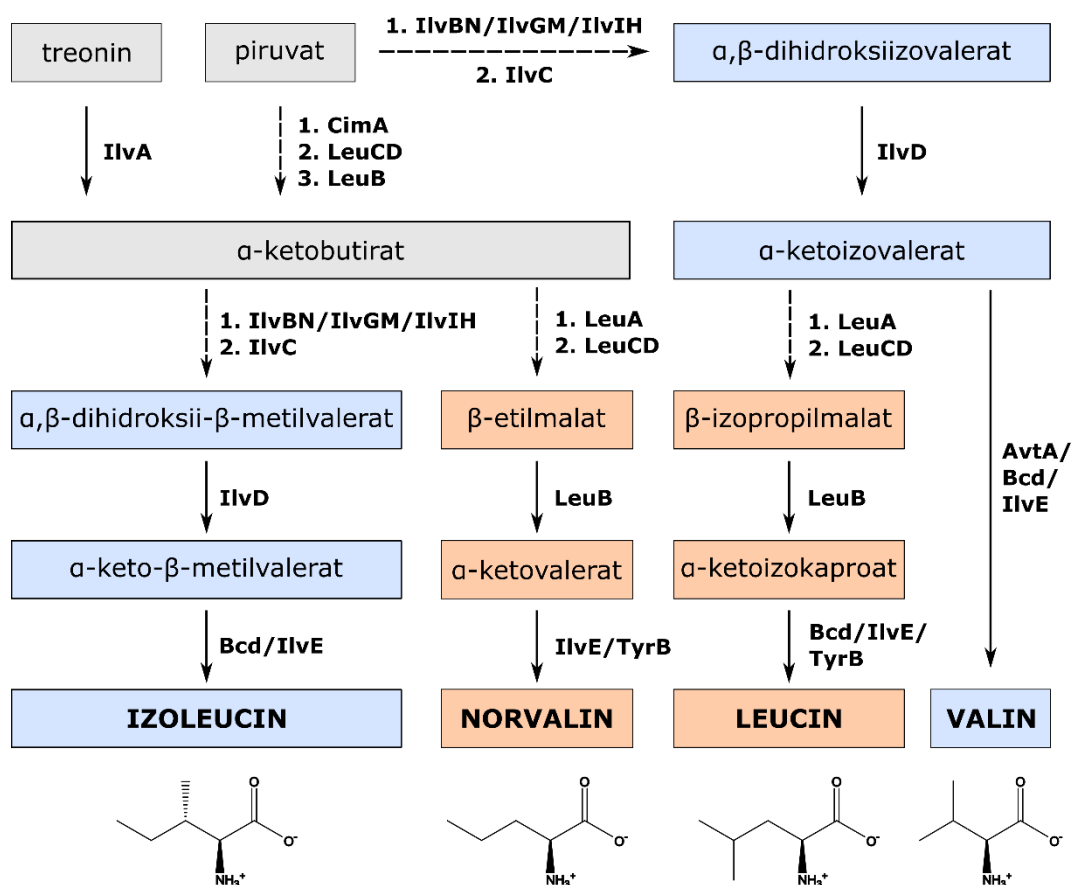
Slika 7. Predviđena struktura izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS) iz bakterije *Escherichia coli* (Uniprot id: P00956) modelom *AlphaFold*. Domene su asignirane na temelju strukturne sličnosti s IleRS iz bakterije *Staphylococcus aureus* (PDB kôd: 1FFY). Slika je napravljena u programu *PyMOL*.

#### 2.2.2.1. Neprirodni supstrati izoleucil-tRNA-sintetaze

Izoleucil-tRNA-sintetaza osim prirodnog izoleucina može aktivirati i njemu strukturno slične aminokiseline kao što su: valin, norvalin, homocistein, cistein,  $\alpha$ -aminobutirat [7] i  $\beta$ -metilnorleucin [53]. Valin i cistein su proteinogene aminokiseline, homocistein međuprodukt biosinteze metionina, a norvalin [10],  $\alpha$ -aminobutirat [54] i  $\beta$ -metilnorleucin [55] nusprodukti biosinteze aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom (engl. *branched-chain amino acids*, BCAA). Ovdje će se detaljnije opisati valin i norvalin koji predstavljaju najveće prijetnje točnosti ugradnje izoleucina u proteom bakterije *E. coli* [8, 56].

Valin, leucin i izoleucin sastavni su dio proteina i po strukturi bočnog ogranka spadaju u grupu aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom. Zbog strukturne sličnosti ovih aminokiselina, njihovi biosintetski putevi su isprepleteni (slika 8) [57, 58, 59]. Valin je u visokim koncentracijama prisutan u bakteriji *E. coli* (4 mmol/L), dok su izoleucin i leucin zastupljeni u manjoj količini (300  $\mu$ mol/L) [9].

U uvjetima manjka kisika u bakteriji *E. coli* odvija se anaerobni metabolizam koji koristi glikolizu kao glavni metabolički put. Zbog pojačanog odvijanja glikolize u anaerobnim uvjetima povisuje se koncentracija piruvata – konačnog produkta glikolize [10]. Povišena koncentracija piruvata uzrokuje povišenje koncentracije ostalih metabolita čiji je prekursor piruvat, kao što je primjerice  $\alpha$ -ketobutirat (slika 8). Navedeni slijed događaja uzrokuje sintezu norvalina iz  $\alpha$ -ketobutirata (prekursora za biosintezu izoleucina) u uvjetima manjka kisika. Biosinteza norvalina uključuje enzime LeuA, LeuCD, LeuB i IlvE koji sudjeluju u biosintezi leucina (slika 8) [10].



**Slika 8. Shema biosinteze norvalina i aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom.** Iscrtanom strelicom prikazan je dio biosintetskog puta koji uključuje više reakcija, a na shemi je skraćen radi jasnoće. Kosom crtom odijeljeni su različiti enzimi koji mogu katalizirati istu reakciju. Biosintezu izoleucina i valina kataliziraju isti enzimi pa su odgovarajući međuprodukti označeni plavom bojom. Analogno vrijedi i za norvalin i leucin kod kojih su međuprodukti označeni narančastom bojom. Slika je napravljena u programu *Inkscape*.

S obzirom da biosinteza norvalina teče uz pomoć istih enzima kao i sinteza aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom (slika 8), fundamentalno je pitanje: zašto norvalin nije proteinogena aminokiselina? Norvalin je prisutan u Millerovim eksperimentima i na ugljičnim hondritima i to u količini usporedivoj ili većoj od ostalih proteinogenih aminokiselina [60], tako da je u ranoj Zemljinoj povijesti bio dostupan za sintezu proteina. Za usporedbu, proteinogeni valin i neproteinogeni norvalin strukturni su izomeri, s jedinom razlikom što norvalin ima linearni, a valin  $\beta$ -razgranati bočni ogranak (slika 8). Mogući razlog zašto bi aminokiseline s razgranatim bočnim ogrankom mogle biti preferirane u odnosu na one s linearnim je sposobnost peptida građenih od aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom da poprime uređeniye strukture [60]. Norvalin u odnosu na valin ima dodatnu os rotacije što bi moglo uzrokovati povećanje pokretljivosti njegovog bočnog ogranka koja nije poželjna u proteinima [60]. Zbog svog  $\beta$ -razgranatog bočnog ogranka izoleucin i valin se primarno nalaze u  $\beta$ -pločama [12], dok norvalin ima snažnu sklonost gradnji  $\alpha$ -zavojnica [14]. Dapače, *in silico* zamjena izoleucina s norvalinom u peptidu koji se sastoji od dva antiparalelna  $\beta$ -lanca pokazuje tendenciju stvaranja  $\alpha$ -zavojnica pri povišenoj temperaturi [13]. Ugradnja norvalina na izoleucinske položaje u proteinima pokazala se toksičnijom od analogne ugradnje valina [8]. Pretpostavljeni uzrok veće toksičnosti norvalina upravo je narušena struktura  $\beta$ -ploča.

### 2.3. Efekti pogrešaka u staničnoj biosintezi proteina

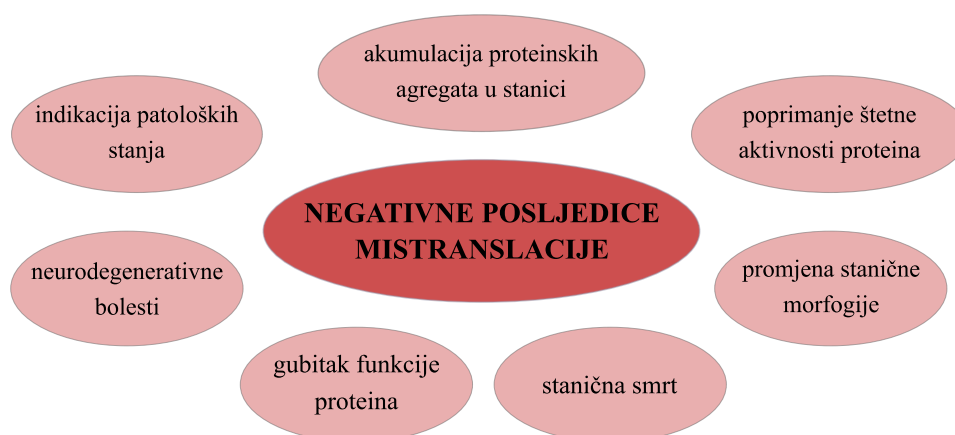
#### 2.3.1. Povezanost mistranslacije s različitim patološkim stanjima

Pogreške u biosintezi proteina uglavnom imaju negativne posljedice za stanicu (slika 9), zbog čega je stanica razvila različite kontrolne mehanizme kako bi vjerno prevela informaciju iz DNA u proteinsku sekvencu. Međutim, proces sinteze proteina skloniji je pogreškama nego što bismo očekivali. U prosjeku se 1 od 1000 aminokiselina netočno ugradi u proteine [1]. Uzevši u obzir da prosječna duljina proteina u bakteriji *E. coli* iznosi 308 aminokiselina, s takvom frekvencijom greške oko 30 % proteina u stanici ima netočno ugrađenu aminokiselinu.

Izazivanje pogrešaka u biosintezi proteina mehanizam je djelovanja aminoglikozidnih antibiotika (npr. streptomycin, neomicin, kanamicin) koji se vežu u A-mjesto 30S podjedinice ribosoma. Vežanje aminoglikozidnog antibiotika mijenja konformaciju A-mjesta i geometriju vežanja aminoacil-tRNA što povećava vjerojatnost ostvarivanja nepripadne kodon-antikodon interakcije [61]. Pogreške u biosintezi proteina dodatkom paromomicina mogu porasti i do 10 puta tako da konačno mogu iznositi do  $10^{-2}$  po kodonu [62] što može rezultirati akumulacijom pogrešno smotanih proteina u stanici [19]. *E. coli* s deaktiviranom domenom za popravak



pogreške IleRS osjetljivija je na ovu vrstu antibiotika zbog intrinzično veće razine pogrešaka u biosintezi proteina [24].



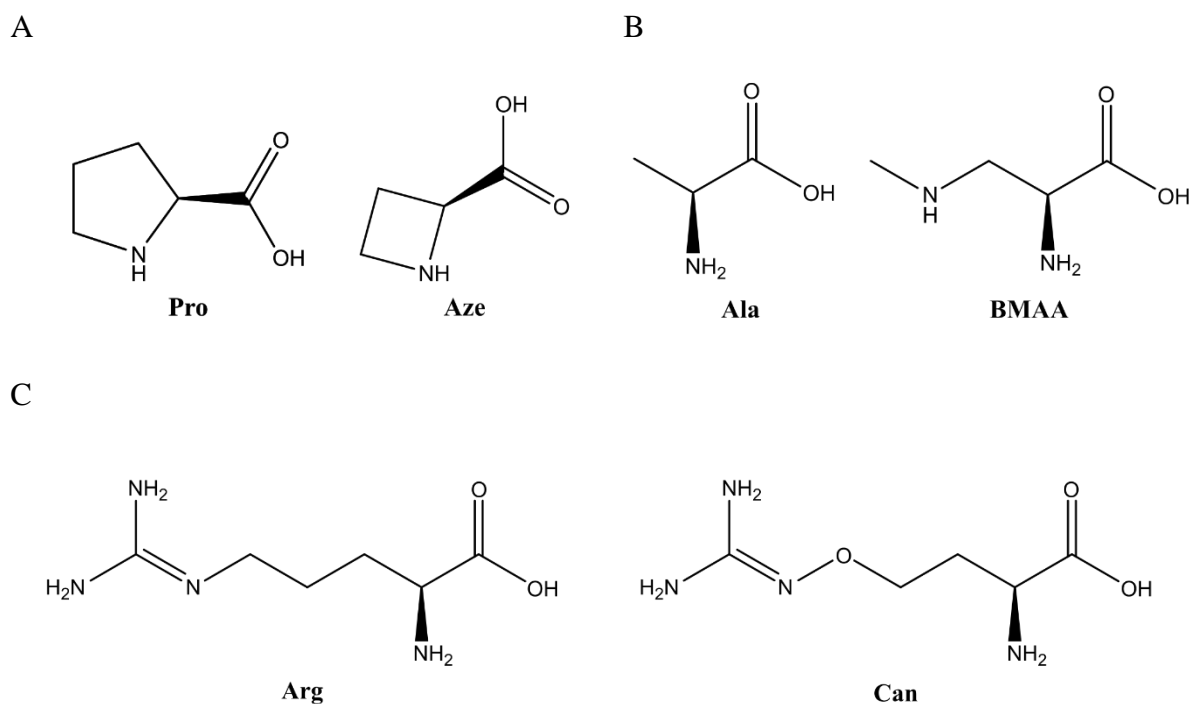
Slika 9. Negativne posljedice mistranslacije. Slika je napravljena u programu *Inkscape*.

Uslijed oksidativnog stresa može porasti količina neproteinogenih aminokiselina koje nastaju djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta. Primjerice, nastanak *ortho*-, *para*- i *meta*- tirozina iz fenilalanina u prisutnosti  $H_2O_2$  i  $FeSO_4$  [63]. Navedeni izomeri tirozina mogu se ugraditi u proteine umjesto fenilalanina uslijed pogreške PheRS. Međutim, istovremeno oksidacija dovodi do strukturnih promjena u  $\beta$ -podjedinici fenilalanil-tRNA-sintetaze (PheRS) iz bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium u kojoj se nalazi domena za popravak pogreške [64]. Uslijed oksidacije dolazi do povećanja vezne površine u domeni za popravak pogreške za čak 50 % što omogućuje uspješnije vezanje i hidrolizu nepripadnih aminoacil-tRNA<sup>Phe</sup>. Drugim riječima, oksidacijski stres istovremeno stvara nepripadne supstrate i poboljšava popravak pogreške u PheRS.

Stanice sa smanjenom translacijskom točnošću imaju veću sklonost pucanju stanične membrane [65], smanjenu pokretljivost zbog manjeg broja flagela [25, 66], smanjenu brzinu rasta [21, 25] i promijenjenu morfologiju [21]. Mistranslacija može utjecati na kognitivne sposobnosti i izgled složenijeg višestaničnog organizma kao što je miš [67]. Iako su sve stanice u višestaničnom organizmu zahvaćene, ovisno o tipu stanice postoje fiziološke razlike u odgovoru na mistranslaciju. Primjerice, neuroni su posebno osjetljivi na mistranslaciju [67, 68], među ostalim i zato što tijekom svog dugog životnog vijeka mogu nakupljati različite vrste pogrešaka. Osim toga, neuroni imaju intrinzično veliki omjer površine u odnosu na volumen stanice što povećava broj potencijalnih žarišta za stvaranje agregata na membrani [69].

Mistranslacija se povezuje s različitim bolestima izazvanim ugradnjom neproteinogenih aminokiselina, često biljnog podrijetla (slika 10). Jedan od takvih primjera je povezanost

multiple skleroze s ugradnjom azetidin-2-karboksilne kiseline (Aze) u proteom stanice. Aze je neproteinogena aminokiselina (slika 10 A) koja se može naći u nekim biljkama (npr. šećernoj repi) i prehranom ulazi u organizam čovjeka [70, 71]. Aze je strukturni analog prolina s jedinom razlikom što ima četveročlani umjesto peteročlanog prstena (jedna  $-CH_2-$  skupina manje). Ljudska prolil-tRNA-sintetaza (ProRS) nema domenu za popravak pogreške, stoga je sklonija pogrešnoj ugradnji Aze u proteine [71]. Početkom 21. stoljeća ustanovljena je poveznica geografske zastupljenosti multiple skleroze i industrije šećerne repe [70]. Iako uzrok multiple skleroze nije poznat, povezuje se s abnormalnostima mijelinskog bazičnog proteina [70] (engl. *myelin basic protein*, MBP) – jednim od najvažnijih proteina u mijelinskoj ovojnici [72]. MBP u svojoj strukturi sadrži visoko sačuvani motiv PRTPPP koji je sa svoja 4 prolina podložan ugradnji Aze [70] koji u višim koncentracijama ulazi u organizam čovjeka u područjima gdje je prehrana šećernom repom učestalija. Sačuvani triplet prolina unutar strukturnog motiva PRTPPP, smatra se ključnim u održavanju strukture MBP-a pa njegova modifikacija zbog ugradnje Aze može utjecati na strukturu cijelog proteina i potencijalno uzrokovati multiplu sklerozu [72].



**Slika 10. Strukture nekih proteinogenih aminokiselina i njihovih biljnih neproteinogenih analoga.** A) Prolin (Pro) i azetidin-2-karboksilna kiselina (Aze), B) alanin (Ala) i  $\beta$ -N-metilamino-L-alanin (BMAA), C) arginin (Arg) i kanavanin (Can). Slika je napravljena u programima *ChemDraw Ultra 12.0* i *Inkscape*.

Biljke, a posebno njihove sjemenke, sadrže različite neproteinogene aminokiseline kojima se nastoje zaštititi od predatora ugrađujući ih u njihove proteome. Primjerice,  $\beta$ -N-metilamino-L-

alanin (BMAA) i kanavanin se mogu naći u sjemenkama biljaka. BMAA je analog alanina (slika 10 B) i supstrat humane alanil-tRNA-sintetaze (AlaRS) [73]. Potencijalni je uzročnik aminotrofične lateralne skleroze (ALS) [73]. Kanavanin je analog arginina (slika 10 C) koji se koristi za skladištenje dušika u sjemenkama mahunarki i može činiti i do 12 % njihove mase [44]. S obzirom na sličnost s argininom, kanavanin je supstrat mnogih arginil-tRNA-sintetaza (ArgRS) [44].

Mistranslacija može biti izazvana nedostatkom pojedine aminokiseline [1, 74], čime se omogućuje biosinteza proteina u uvjetima starvacije. Organizmi koji ne mogu sintetizirati sve aminokiseline (auksotrofi) u uvjetima njihova manjka koriste mistranslaciju kao mehanizam preživljavanja [1]. Nedostatak aminokiseline može biti izazvan specifičnim staničnim okruženjem. Primjerice, u tumorskim tkivima povećana koncentracija interferona- $\gamma$  inducira ekspresiju enzima uključenog u katabolizam triptofana [74]. Smanjena koncentracija triptofana uzrokuje supstituciju triptofana fenilalaninom u proteomu tumorskih stanica [74].

Uzevši u obzir raznolikost aminokiselina i njihovih funkcija u proteinima nije iznenađujuće da je supstitucija nekih aminokiselina toksičnija od drugih. Toksičnost supstitucije ovisi o nekoliko faktora. Jedan od njih je učestalost pojedine aminokiseline u proteomu stanice. Ala i Leu su najzastupljenije aminokiseline u bakterijskim proteinima s frekvencijom od oko 10 % [75, 76] pa njihova supstitucija obuhvaća velik dio proteina. S obzirom na toksičnost zamjene učestalih aminokiselina, i LeuRS i AlaRS imaju domenu za popravak pogreške [3] (uz rijetke iznimke mutacija u domeni za popravak pogreške LeuRS bakterija roda *Mycoplasma* [6]), a AlaRS uz to i trans faktor za popravak pogreške [47]. Osim o učestalosti, toksičnost zamjene pojedine aminokiseline ovisi i o njezinoj funkciji u proteinima. Supstitucija aminokiseline koja se nalazi u aktivnom mjestu bit će toksičnija od one koja se nalazi na mjestima koja nisu presudna za funkciju proteina. Nadalje, toksičnost zamjene ovisi i o kemijskoj prirodi zamjene. Supstitucija hidrofobnog alanina hidrofobnim serinom izaziva negativnije efekte za stanicu od zamjene treonina serinom [21] jer uzrokuje promjenu polarnosti zamijenjene aminokiseline. Zamjena alanina serinom jedna je od najistraživanijih vrsta mistranslacije [19, 25, 26, 67] zbog širokog spektra patoloških stanja s kojima je povezana. Mala razina mistranslacije Ala  $\rightarrow$  Ser utječe na rast bakterije *E. coli* i uzrokuje velike promjene u proteostazi bakterije uzrokujući diferencijalnu ekspresiju preko 800 proteina [21]. U kvascu povećava unos i biosintezu aminokiselina te povećava osjetljivost na povišenu temperaturu [26]. Mistranslacija Ala  $\rightarrow$  Ser kod miša izaziva krivo smatanje proteina i neurodegenerativne

promjene u Purkinjeovim neuronima [67]. S obzirom na visoku štetnost mistranslacije Ala → Ser, kralježnjaci su razvili poseban mehanizam kojim se sprječava vezanje serina na tRNA<sup>Ala</sup> [77]. Posebni ANKRD16 protein veže se na katalitičku domenu AlaRS i veže Ser-AMP nastao u njoj [77]. Na taj način, smanjuje se neurodegenerativni fenotip u neuronima miša koji nose mutaciju u domeni za popravak pogreške AlaRS.

Unatoč navedenom primjeru, mutacije u domeni za popravak pogreške nisu jedina indikacija da će doći do fenotipskih promjena. Npr. bakterija *E. coli* koja nosi mutacije u domeni za popravak pogreške IleRS [8] ili PheRS [63] koje deaktiviraju njezinu hidrolitičku aktivnost rastu jednako dobro kao i divlji tip bakterije u uvjetima gdje nije povećana količina neprikladne aminokiseline u mediju.

### 2.3.2. Pozitivne posljedice mistranslacije

Biosinteza proteina je proces u stanici kod kojega je važno optimizirati i brzinu, i točnost [32]. Različiti fiziološki uvjeti utječu na točnost biosinteze. Kao što je ranije spomenuto, ukoliko je bakterija auksotrof za određenu aminokiselinu, njezin nedostatak uzrokuje povišenu mistranslaciju na odgovarajućim mjestima u proteomu [1]. Bakterija *Acinetobacter baylyi* s mutacijama u IleRS koje uzrokuju Ile → Val mistranslaciju može brže rasti od divljeg tipa bakterije u uvjetima manjka izoleucina [23]. Osim toga, točnost biosinteze proteina smanjuje se ukoliko bakterija raste uz nedostatak nutrijenata [78]. Greške u translaciji ubrzavaju sintezu proteina [79] i u uvjetima nedostatka hranjivih tvari omogućuju preživljavanje bakterije.



Slika 11. Pozitivne posljedice mistranslacije. Slika je napravljena u programu *Inkscape*.

Mistranslacija omogućava adaptaciju stanice na drugu vrstu stresa kao što su toplinski [19] ili oksidativni stres [35]. Supstitucija asparagina aspartatom povećava količinu transkripata

glavnih šaperona u bakteriji *E. coli*: DnaK i GroEL [16]. Povećana količina šaperona i proteaza posljedica je povećane količine RpoH i RpoS proteina, dvaju različitih sigma podjedinica RNA-polimeraze [23, 80]. RpoH i RpoS omogućavaju transkripciju gena uključenih u stanični odgovor na stres kao što su šaperoni i proteaze. Povećana količina navedenih proteina omogućava brži odgovor stanice (adaptaciju) na drugu vrstu stresa. Osim povećane ekspresije šaperona i proteaza, pronađeno je da se u uvjetima oksidacijskog stresa metionin nespecifično ugrađuje u proteom sisavaca [35] i bakterija [81]. Kod sisavaca u uvjetima oksidativnog stresa dolazi do fosforilacije dvaju serinskih bočnih ogranaka na metionil-tRNA-sintetazi što povećava njezin afinitet prema neprikladnim molekulama tRNA [36]. Kod bakterija se sličan efekt javlja uslijed smanjenja udjela sukciniliranih lizinskih bočnih ogranaka na MetRS [81]. Povećanje udjela metionina u proteinima korisno je za stanicu jer je njegov bočni ogranak podložan reverzibilnoj oksidaciji izazvanoj reaktivnim kisikovim vrstama [22]. Usmjeravanjem reaktivnih kisikovih vrsta u reakciju s metioninskim bočnim ogrankom, umanjuje se njihovo štetno djelovanje u ostatku stanice. Oksidirani metioninski bočni ogranci mogu se uz djelovanje enzima vratiti u izvorno stanje pa tako stanica može zadržati funkciju proteina i u uvjetima oksidacijskog stresa.

Osim u bakterijama i eukariotima, misacilacija metioninom prisutna je i u arhejama. Arheja *Aeropyrum pernix* prirodno je zastupljena u hidrotermalnim izvorima na japanskoj obali s optimalnom temperaturom rasta između 90 i 95 °C [82]. Ukoliko *A. pernix* raste na nižoj temperaturi (75 °C), dolazi do supstitucije Leu → Met jer MetRS prepoznaje i aminoacilira tRNA<sup>Leu</sup> [81]. Vezanje nepripadne tRNA<sup>Leu</sup> na MetRS regulirano je temperaturom jer ove vrste mistranslacije nema pri višim temperaturama. Zašto bi arheja vršila mistranslaciju Leu → Met pri nižoj temperaturi? Za ovu vrstu aminokiselinske supstitucije pokazano je da povećava fleksibilnost proteina [83] što je mogući razlog povećane aktivnosti citrat-sintaze pri nižim temperaturama [81]. Viša mistranslacija pri nižoj temperaturi primijećen je fenomen i u bakteriji *Bacillus subtilis* [84].

Mistranslacija omogućava nastanak različitih formi istog proteina i potencijalno može proširiti njegovu funkciju u nestandardnim uvjetima [79]. Proteini imaju uski raspon pH ili temperature u kojem optimalno rade, dok se stanice često nalaze u neoptimalnim uvjetima. Povećanje raznolikosti proteoma izazvano mistranslacijom potencijalno može biti korisno u uvjetima u kojima protein ne radi optimalno. Kontrolirana razina i vrsta mistranslacije hipotetski može omogućiti nastanak manje grupe proteina sa zadržanom strukturom i

proširenim spektrom aktivnosti. Pretpostavlja se da je statistički proteom postojao u ranoj evolucijskoj prošlosti u primitivnim stanicama tijekom evolucije moderne mašinerije za sintezu proteina [85]. Spontane greške u translaciji u bakteriji *Bacillus subtilis* povećavaju se sa smanjenjem temperature rasta i tijekom stacionarne faze rasta [84]. Pogreške u translaciji mogu poništiti efekt nekih mutacija koje bi inače mogle nepovoljno djelovati na organizam, kao npr. mutacija u genu za otpornost na antibiotik [84].

Mistranslacija je posebno korisna za patogene organizme jer omogućuje proširenje formi istog proteina u različitim uvjetima i tako proširuje raznolikost njihovih antigena. Bakterije roda *Mycoplasma* sadrže mutacije ili deleciju domene za popravak pogreške u jednom ili više sljedećih enzima: fenilalanil-tRNA-sintetaza (PheRS), treonil-tRNA-sintetaza (ThrRS) i leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) [6]. Mutacije se nalaze na mjestima ključnim za njihovu katalitičku aktivnost i uzrokuju povećanu razinu mistranslacije u bakteriji (slika 12 A).

Gljivice roda *Candida*, za razliku od ostalih eukariota, prevode CUG kodon kao serin, umjesto kao leucin čime odstupaju od standardnog genetičkog koda [86]. *Candida albicans* se kroz literaturu pojavljuje kao primjer mistranslatirajućeg organizma jer sadrži tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> koju uz SerRS, prema rezultatima Gomes i suradnika, u određenoj mjeri prepoznaje i aminoacilira LeuRS, što dovodi do ugrađivanja leucina umjesto serina u proteom stanice [87]. Razina mistranslacije Ser → Leu kreće se između 3 i 5 %, varirajući s temperaturom i nekim drugim čimbenicima [87]. Umjetno izazvana mistranslacija Ser → Leu u drugom organizmu – kvascu, uzrokuje otpornost na različite vrste stresora kao što su izloženost oksidansima, teškim metalima, fungicidu i hiperosmotskom učinku [88]. CUG kodon spada u klasu dvosmislenih kodona koji se mogu translatirati u dvije vrste aminokiseline. Međutim, nedavna proteogenomska analiza dovela je u pitanje otkriće dvosmislenog kodona u rodu *Candida* pokazujući da nema razlike između mistranslacije leucinom na CUG kodonu i kontrolnim kodonima: serinskom UCC i leucinskom CUC [89]. Prema radu Mühlhausen i suradnika, mistranslacija Ser → Leu nije ništa češća od drugih vrsta mistranslacije i postoji dobra mogućnost da je detektirana samo uslijed kontaminacije uzoraka bakterijom *E. coli* [89]. Zbog kontradiktornih zaključaka iz različitih studija, ova tema zahtijeva daljnja istraživanja.

Osim kontroverznog dvosmislenog CUG kodona u gljivicama roda *Candida*, nedavno je pronađen slučaj dvosmislenog alaninskog kodona (GCU) u četiri vrste biljnih patogenih bakterija roda *Streptomyces* [90]. U njima je pronađena netipična vrsta prolil-tRNA-sintetaze



Molekula tRNA<sup>ProA</sup> nosi antikodon za alanin, ali sadrži elemente identiteta karakteristične za ProRS. ProRSx i tRNA<sup>ProA</sup> specifično interagiraju jedno s drugim i prevode alaninske kodone kao prolin (slika 12 B) [90]. To je jedini poznati par aaRS i tRNA koji svojim dizajnom uvodi aminokiseline koje nisu kodirane standardnim genetičkim kodom.

Dugotrajna mistranslacija uzrokuje pojačanu stopu mutacija što može povećati broj stanica otpornih na antibiotik [91]. Pretpostavljeni mehanizam učestalije stope mutacija na DNA uključuje SOS odgovor [91]. Mistranslacija glutamina u glutamat, odnosno asparagina u aspartat pronađena je u bakteriji *Mycobacterium smegmatis* i uzrokuje njezinu otpornost na antibiotik rifampicin [20]. U kliničkim izolatima bakterije *Mycobacterium tuberculosis* pronađeno je nekoliko mutacija u genu *gatA* koji kodira podjedinicu glutamin-amidotransferaze (GatCAB) zadužene za transamidaciju Glu-tRNA<sup>Gln</sup> u Gln-tRNA<sup>Gln</sup>, odnosno Asp-tRNA<sup>Asn</sup> u Asn-tRNA<sup>Asn</sup> [92]. Neke od navedenih mutacija povećavaju razinu mistranslacije u bakteriji (slika 12 C). Bočni ogranak Asn518 na β-podjedinici RNA-polimeraze u *M. tuberculosis* sačuvan je u bakterijama *E. coli* i *M. smegmatis* i identificiran kao bočni ogranak čija mutacija uzrokuje otpornost na rifampicin [92, 93]. Prema tome mehanizam otpornosti na rifampicin uključuje supstituciju sačuvanog Asn unutar RNA-polimeraze u Asp [92].

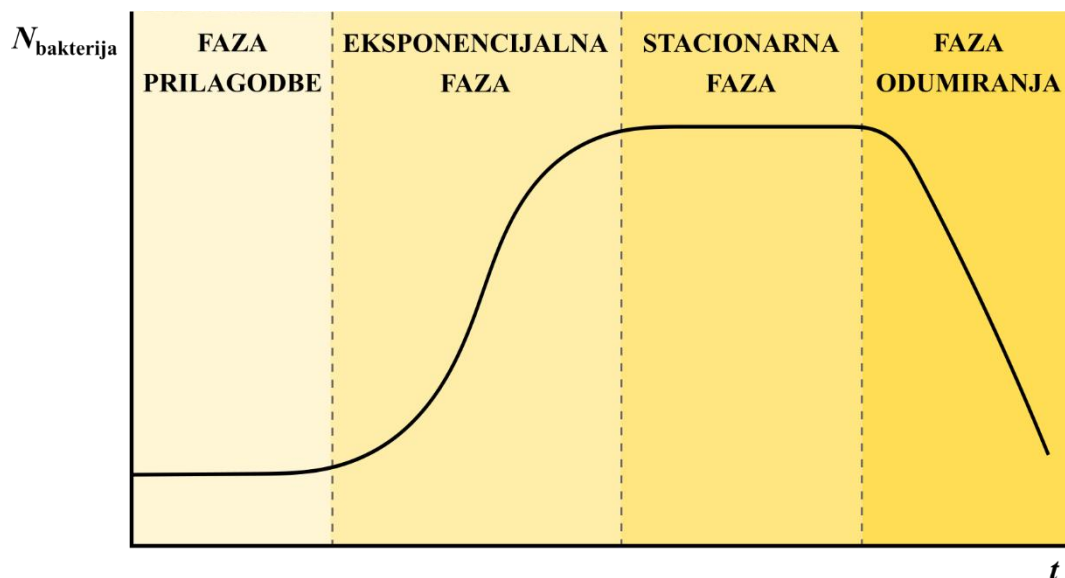
### 2.3.3. Razina mistranslacije mijenja se s fazom rasta bakterija

Ovisno o uvjetima u okolišu, bakterija mijenja ekspresiju proteina i vrijeme potrebno za diobu stanica. Klasičnu krivulju rasta bakterija možemo podijeliti na fazu prilagodbe, eksponencijalnu fazu, stacionarnu fazu i fazu odumiranja (slika 13). Na početku bakterijama treba određeno vrijeme da se prilagode na uvjete u okolišu (faza prilagodbe), nakon čega slijedi vrijeme ubrzanog rasta (eksponencijalna faza). U trenutku u kojem su bakterije iskoristile hranjivi medij i zasitile okolinu dolazi do prestanka diobe (stacionarna faza), nakon čega postupno dolazi do njihovog umiranja (faza odumiranja). Tijekom stacionarne faze dolazi do promjene u ekspresiji proteina, u bakteriji *E. coli* prelazak u stacionarnu fazu uzrokovan je povećanom količinom proteina RpoS [94]. RpoS je sigma podjedinica RNA-polimeraze koja regulira ekspresiju 10 % gena u bakteriji *E. coli* [95].

Mordret i suradnici analizirali su različite vrste mistranslacije u bakteriji *E. coli* u različitim fazama rasta [1]. Nisu primijetili razliku u razini mistranslacije između eksponencijalne i stacionarne fazi rasta u laboratorijskom soju bakterije *E. coli*. Međutim, ukoliko je bakterija auksotrof za serin tijekom stacionarne faze dolazi do povećanja mistranslacije: smanjenje količine serina dostupnog stanici povećava vjerojatnost ugradnje



neke druge aminokiseline. Jednako tako, Meyerovich i suradnici primijetili su da je razina mistranslacije u stacionarnoj fazi bakterije *Bacillus subtilis* dva puta veća nego u eksponencijalnoj [84].



**Slika 13. Shema krivulje rasta bakterija.** Krivulja se može podijeliti u četiri različite faze. Na početku se bakterije prilagođavaju na medij u kojem rastu. Nakon prilagodbe dolazi do ubrzane diobe u eksponencijalnoj fazi koja se u stacionarnoj fazi usporava kada bakterija iscrpi zalihe nutrijenata u mediju u kojem raste. Tijekom faze odumiranja, bakterije umiru zbog nedostatka nutrijenata. Slika je napravljena u programu *Inkscape*.

Pritom su pokazali da veća mistranslacija u stacionarnoj fazi nije uzrokovana pukim nakupljanjem grešaka u bakteriji s duljim vremenom diobe, nego u stacionarnoj fazi stanica učestalije griješi. Sličan efekt primijećen je i kod bakterije *Mycobacterium smegmatis*, gdje je u stacionarnoj fazi rasta uočena dvaput učestalija supstitucija aspartata asparaginom, odnosno pet puta učestalija supstitucija glutamata glutaminom [20]. Osim toga, u istoj bakteriji otkrivene su povećane stope mistranslacija i nekih drugih aminokiselina kodiranih specifičnim kodonima [96].

Jedan od razloga za povećanu mistranslaciju u stacionarnoj fazi, mogao bi biti nedostatak nutrijenata (starvacija). Primijećeno je da se broj ribosomskih pogrešaka u bakteriji *E. coli* povećava uslijed starvacije glukozom uzrokujući porast broja proteinskih izoformi [78]. Ribosomske pogreške uključuju pomak okvira čitanja (engl. *frameshift*) koje uzrokuju nastanak nefunkcionalnih proteinskih formi [97]. Nedostatak pojedinih nutrijenata čest je fenomen u tumorskim tkivima gdje je otkrivena povećana stopa  $\text{Trp} \rightarrow \text{Phe}$  mistranslacije koja može proširiti raznolikost antigena na površini tumorske stanice [74] i tako onemogućiti odgovor imunološkog sustava.

## 2.4. Proteomika i globalna analiza pogrešaka u biosintezi proteina

### 2.4.1. Proteomika temeljena na spektrometriji masa

Proteomika je znanost koja proučava proteom – kompleksni sustav proteina i njihovih proteinskih varijanti, tzv. proteoformi u stanici. S obzirom na veliki broj različitih proteina koji u bakteriji *E. coli* iznosi oko 4500, a u ljudskim stanicama seže i do oko 82 500 [98], proteomika zahtjeva uporabu precizne i kompleksne instrumentacije. Spektrometar masa je instrument koji omogućava analizu kompleksnih smjesa razdvajanjem iona prema njihovom omjeru mase i naboja. Rezultat mjerenja je spektar masa koji prikazuje ovisnost intenziteta iona o omjeru mase i naboja.

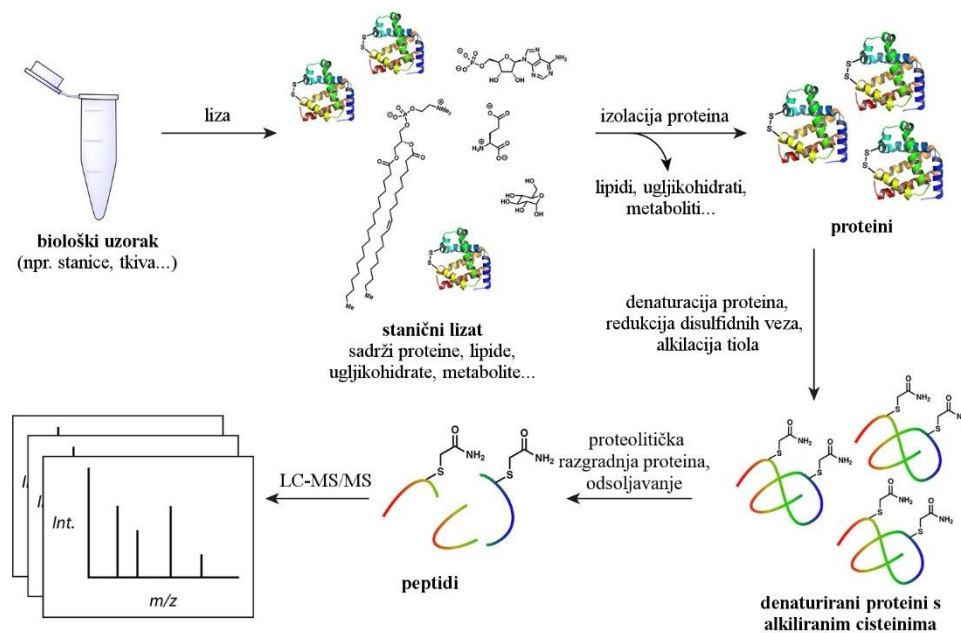
Proteomika temeljena na spektrometriji masa obično se dijeli na dva metodološki različita pristupa analizi proteinskih smjesa: odozdo-nagore (engl. *bottom-up proteomics*) ili odozgor-nadolje (engl. *top-down proteomics*) [99]. Proteomika odozgor-nadolje analizira intaktne proteine omogućujući analizu proteinskih izoformi, tzv. proteoformi. U proteoforme nekog proteina spadaju sve njegove različite molekularne forme, uključujući genetske varijacije, produkte nastale alternativnim prekrajanjem mRNA i proteine s različitim posttranslacijskim modifikacijama [100]. Budući da se jedan protein može naći u puno različitih nabijenih formi od kojih svaka ima svoju izotopnu distribuciju u spektru masa, obrada podataka dobivenih proteomikom odozgor-nadolje vrlo je kompleksna. Metode koje omogućavaju asigniranje pojedinih signala u spektru masa još uvijek se razvijaju [101]. S obzirom na sve navedeno, proteomika odozgor-nadolje još uvijek se primarno koristi za analizu jednostavnih proteinskih smjesa i za proteine male molekulske mase [102].

Proteomika odozdo-nagore omogućava analizu kompleksnijih proteinskih smjesa tako da ih se najprije pocijepa u manje peptide. Nastali peptidi odvajaju se tekućinskom kromatografijom koje se pri izlasku s kolone analiziraju spektrometrijom masa (detaljnije opisano u potpoglavlju 2.4.2).

### 2.4.2. Priprema uzorka za analizu proteomikom odozdo-nagore

Proteomika odozdo-nagore omogućava identifikaciju velikog broja proteina u kompleksnim smjesama kao što su stanice ili tkiva [103]. Iz uzorka stanice ili tkiva najprije se ekstrahira stanični ekstrakt iz kojeg se istalože proteini (slika 14). Izolirani proteini resuspendiraju se u denaturirajućem puferu, obično s visokom koncentracijom ureje, nakon čega slijedi njihova redukcija i alkilacija disulfidnih veza. Proteini se potom pocijepaju u peptide uz uporabu

proteaza, najčešće uzastopnim dodatkom endoproteaze LysC pa tripsina. Tripsin cijepa peptidnu vezu na C-terminalnoj strani pozitivno nabijenih bočnih ogranaka arginina (Arg) i lizina (Lys), a LysC na C-terminalnoj strani Lys. Simultana uporaba dviju proteaza koje cijepaju proteine na redundantnim mjestima smanjuje količinu nepotpuno cijepanih peptida [104]. Za razliku od tripsina, LysC je aktivan pri visokim koncentracijama ureje (6-8 mol/L) koje se tipično nalaze u puferu za denaturaciju proteina [105]. Osim toga, LysC s većom učestalošću nego tripsin cijepa peptidnu vezu Lys i prolina (Pro) te peptidnu vezu ukoliko je Lys okružen kiselim aminokiselinama [104]. Postoji nekoliko razloga zašto su tripsin i LysC najčešće korištene proteaze, a među glavnima je da cijepanjem daju peptide odgovarajuće veličine koje su pogodne za analizu spektrometrijom masa (7-30 aminokiselina), a nastali peptidi u pravilu nose pozitivni naboj što se dodatno potiče dodatkom mravlje kiseline. Nakon proteolitičke razgradnje slijedi odsoljavanje proteina ekstrakcijom na krutoj fazi nakon čega su peptidi prebačeni u otapalo pogodno za LC-MS/MS analizu kao što je vodena otopina mravlje kiseline (0,1 %) i male količine acetonitrila (< 5 %).



**Slika 14. Shema pripreme uzorka za analizu proteina pristupom odozdo-nagore (engl. *bottom-up*).** Proteini se pročiste iz staničnog ekstrakta izoliranog iz tkiva ili stanica, nakon čega slijedi njihova denaturacija, redukcija disulfidnih veza i alkiliranje. Cijepanjem proteazama nastaju peptidi koji se potom analiziraju metodom LC-MS/MS. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [103].

Ukoliko je smjesa peptida vrlo kompleksna, može se dodatno razdvojiti (frakcionirati) na više frakcija uz uporabu različitih metoda kao što su 1D ili 2D poliakrilamidna elektroforeza, ionsko-izmjenjivačka kromatografija (engl. *strong cation exchange chromatography*, SCX ili

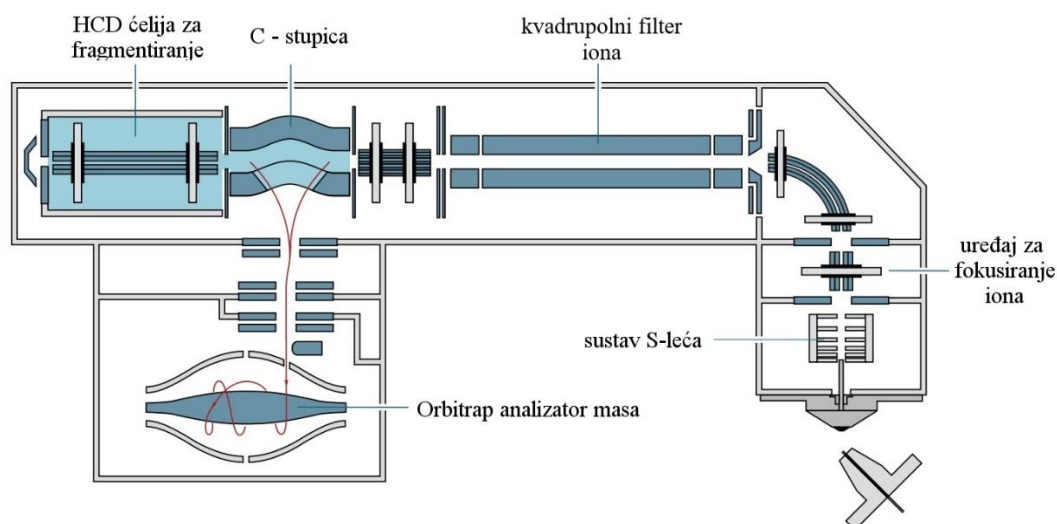
engl. *strong anion exchange chromatography*, SAX) ili kromatografija hidrofilnih interakcija (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC).

#### 2.4.3. Analiza smjese peptida LC-MS/MS metodom

Odsoljena smjesa peptida spremna je za razdvajanje tekućinskom kromatografijom (engl. *liquid chromatography*, LC) spregnutom sa spektrometrom masa (LC-MS/MS). Kako bi se omogućila visoka rezolucija u razdvajanju kompleksne smjese peptida, kromatografija se provodi pri ultra visokom tlaku (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC) s nanolitarskim protocima koji omogućavaju uporabu male količine uzorka (0,1-1 µg) [103]. Kromatografija obrnutih faza (engl. *reverse phase chromatography*, RPC) najčešća je vrsta kromatografije koja prethodi spektrometriji masa [103]. Stacionarna faza RPC kolone sadrži nepolarni ugljikovodični lanac s 18 C-atoma (skraćeno: C18). Nakon nanošenja na kolonu, peptidi postepeno izlaze kako se povećava udio acetonitrila u mobilnoj fazi. Polarni peptidi kraće se zadržavaju na kromatografskoj koloni, a nepolarni duže. Vrijeme provođenja kromatografije traje između 30 i 180 min, ovisno o kompleksnosti smjese koja se analizira [103].

Pri izlasku s kromatografske kolone, peptidi se ioniziraju, a nastali ioni kontinuirano unose u spektrometar masa. Najčešći oblik ionizacije peptida pri izlasku s kolone je ionizacija elektrosprejem (engl. *electrospray ionisation*, ESI). Smjesa peptida prolazi kroz usku, vruću metalnu kapilaru pod visokim naponom (2-6 kV) koji je za analizu peptida u pravilu pozitivan [106]. Pod utjecajem visoke temperature i napona, peptidi se desolvatiraju, ioniziraju i ulaze u spektrometar masa [103]. Na tržištu postoji velik broj različitih spektrometara masa koji variraju prema namjeni za koju se koriste i broju analizatora masa koje sadrže. Spektrometri masa koji se koriste za proteomska istraživanja imaju barem dva analizatora masa, u najčešćim kombinacijama kvadrupol i orbitrap (instrument *Q Exactive* proizvođača *Thermo Fisher Scientific*) ili kvadrupol i TOF (instrument *timsTOF* proizvođača *Bruker*) [103]. Prošle godine, predstavljen je novi superiorni spektrometar masa *Orbitrap Astral* koji po prvi put kombinira *Orbitrap* i inovativnu tehnologiju sličnu TOF-u čime je trajanje analize smanjeno više od reda veličine u odnosu na dosadašnje spektrometre masa, dok se istovremeno ne gubi na osjetljivosti detekcije [107]. S obzirom da su u eksperimentima u ovoj doktorskoj disertaciji korišteni spektrometri masa iz serije *Q Exactive* (slika 15), princip rada spektrometra masa bit će opisan na njihovom primjeru.

Pri ulasku u *Q Exactive* spektrometar masa, ioni se fokusiraju sustavom S-leća i ulaze u kvadrupol – analizator masa koji se sastoji od 4 šipke (slika 15). Kvadrupol u konfiguraciji s orbitrapom služi kao filter koji može raditi na dva načina: propuštajući ione širokog ili vrlo uskog raspona  $m/z$ . Ukoliko propušta ione širokog raspona  $m/z$  (otprilike 400 – 1600  $m/z$ ), propušteni ioni ulaze u C-stupicu, tamo se kratko vrijeme akumuliraju i zatim istodobno ubacuju u orbitrap [103]. Orbitrap je naziv za analizator masa koji se sastoji od centralne elektrode oblika vretena i vanjske elektrode koja okružuje vreteno [108]. Nabijeni peptidi ulaze u orbitrap okomito na os vretena i formiraju stabilne putanje koje nastaju kao rezultat dvije vrste gibanja: kružnog gibanja oko vretena i oscilacija duž osi vretena koje se mogu opisati aksijalnom frekvencijom [108]. Svaki ion fluktuirira specifičnom aksijalnom frekvencijom koja je obrnuto proporcionalna korijenu  $m/z$ .

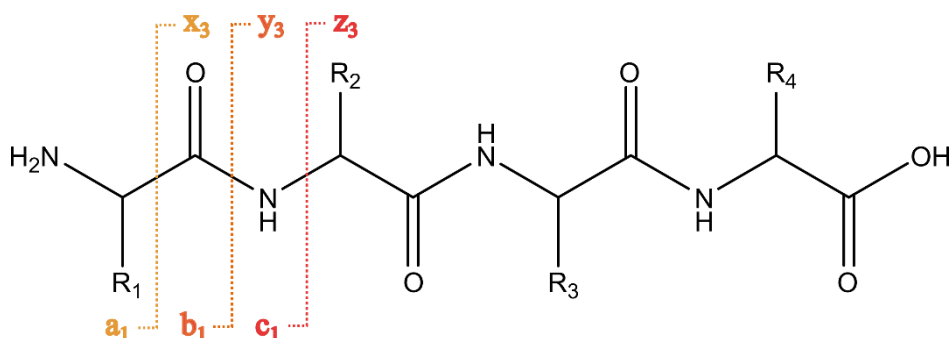


**Slika 15.** Shema unutrašnjosti spektrometra masa *Q Exactive* serije proizvođača *Thermo Fisher Scientific*. Ioni se ioniziraju pri izlasku s kromatografske kolone (dolje desno) prije ulaska u spektrometar masa. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [109].

Specifičnost orbitrapa u odnosu na druge analizatore masa je vrlo visoka točnost ( $< 1$  ppm) i visoka rezolucija koja omogućava razdvajanje iona vrlo sličnih masa [103]. Kao rezultat mjerenja u kojem kvadrupol propušta ione širokog raspona  $m/z$  nastaje MS1 spektar – graf ovisnosti intenziteta signala iona o omjeru mase i naboja. U kompleksnim proteomskim uzorcima s puno različitih proteina koji nakon proteolitičke razgradnje rezultiraju još većim setom peptida, postoji previše peptida da bi se samo na temelju njihovog  $m/z$  odredio identitet peptida. Osim toga, MS1 spektar ne daje strukturne informacije o slijedu aminokiselina u peptidima. Kako bi se dobila ta informacija potrebno je fragmentirati peptid i na temelju spektra nastalih fragmenata (MS2 spektra) odrediti identitet peptida.

Ovisno o tome kako se generiraju MS2 spektri govorimo o dvjema tehnikama snimanja spektara: analizi ovisnoj o MS1 spektru (engl. *data dependent acquisition*, DDA) ili analizi neovisnoj o MS1 spektru (engl. *data independent acquisition*, DIA). U analizi ovisnoj o MS1 spektru (DDA) se za fragmentaciju odabire nekoliko iona s najvišim intenzitetom u MS1 spektru. Kvadrupol zatim radi kao filter za izolaciju pojedinog peptidnog iona koji se kratko vrijeme nakuplja u C-stupici i fragmentira u kolizijskoj ćeliji (slika 15). U slučaju analize neovisne o MS1 spektru (DIA) svi ioni prisutni u MS1 spektru se podvrgavaju fragmentaciji tako da se raspon  $m/z$  MS1 spektra sustavno razdjeli na niz dijelova unutar kojih se više različitih iona istovremeno fragmentira. Takva metoda generira kompleksne MS2 spektre jer se u pravilu zajednički fragmentira nekoliko peptida. Prednost analize neovisne o MS1 spektru (DIA) je u tome što se svi peptidi iz MS1 spektra fragmentiraju, neovisno o zastupljenosti, dok se kod analize ovisne o MS1 spektru (DDA) fragmentiraju samo zastupljeniji peptidi.

Postoji nekoliko tehnika fragmentacije peptida, međutim u modernoj proteomici koriste se dvije: disocijacija inducirana sudarom (engl. *collision induced dissociation*, CID) ili disocijacija inducirana prijenosom elektrona (engl. *electron transfer dissociation*, ETD). Disocijacija inducirana sudarom temelji se na sudaranju peptidnih iona s molekulama inertnog plina (obično dušika) čime dolazi do cijepanja peptidnih veza i nastajanja b i y vrste fragmentnih iona (slika 16).



**Slika 16. Shema fragmentacije peptida u tandemnom spektrometru masa.** Cijepanjem veze između  $\alpha$ -ugljikovog atoma i karbonilnog ugljikovog atoma nastaju ioni a i x serije. Cijepanjem veze između karbonilnog ugljikovog atoma i dušikovog atoma nastaju ioni b i y serije. Cijepanjem veze između dušikovog atoma i  $\alpha$ -ugljikovog atoma nastaju ioni c i z serije. A, b i c ionima nazivaju se fragmenti koji sadrže N-kraj peptida, a x, y, z ionima nazivaju se fragmenti koji sadrže C-kraj peptida. Broj u indeksu slova predstavlja broj aminokiselinskih bočnih ograna u tom fragmentu. Slika je napravljena u programima ChemDraw Ultra 12.0 i Inkscape.

Disocijacija inducirana prijenosom elektrona temelji se na sudaranju peptidnih iona s anionskim radikalima čime dolazi do prijenosa slobodnog elektrona na peptid [110]. Nastali peptidni radikal je nestabilan i fragmentira na c i z vrstu iona (slika 16). Fragmenti peptida ulaze u C-stupicu otkud se šalju u orbitrap analizator masa. Na taj način nastaje tandemni, MS/MS ili MS2 spektar pojedinog peptida. MS2 spektar sadrži strukturne informacije o peptidu. Savršeni

MS2 spektar omogućava i *de novo* određivanje primarne strukture (slijeda aminokiselina) nepoznatog peptida. Međutim, u praksi MS2 spektar pojedinog peptida iz kompleksne smjese proteoma nije potpun i nije pogodan za *de novo* sekvenciranje. Zato se pri analizi kompleksnih proteoma koristi drukčiji pristup za identifikaciju pojedinih peptida koji će više biti opisan u idućem potpoglavlju.

#### 2.4.4. Identifikacija proteina spektrometrijom masa

Rezultat analize proteoma LC-MS/MS metodom je datoteka sa sirovim podacima koja sadrži podatke o snimljenim spektrima: svakog s odgovarajućim retencijskim vremenom,  $m/z$  vrijednostima, intenzitetima i drugim podacima. Nastali sirovi podaci procesiraju se različitim programima kao što su *MaxQuant* [111] ili *Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific)* čime se kao rezultat dobiva lista identificiranih peptida i proteina. Najuobičajeniji oblik procesiranja je identifikacija peptida pretragom proteomske baze podataka (engl. *database search*) [103]. U odgovarajući program za procesiranje podataka unesu se eksperimentalno dobivene datoteke sa sirovim podacima i proteomska baza podataka (u FASTA formatu) koja odgovara organizmu iz kojeg proteini potječu. Odgovarajuću bazu podataka proteina moguće je pronaći na dvjema najpoznatijim bazama podataka *UniProt* ili NCBI. U programu se zatim definiraju i ostali eksperimentalni parametri kao što su primjerice vrsta proteaze koja se koristila u eksperimentu (obično tripsin), vrsta i pozicija posttranslacijskih modifikacija na peptidima ili vrsta izotopne oznake ukoliko je korišteno izotopno označavanje peptida (vidi potpoglavlje 2.4.5. za detalje), nakon čega se pokrene procesiranje [112]. Ovakav način identifikacije peptida/proteina ima svoju manu: ukoliko se sekvenca proteina ne nalazi u bazi podataka, taj protein ne može biti identificiran iako možda postoji u uzorku.

Na temelju baze podataka, program za procesiranje podataka generira listu svih peptidnih sljedova koji teorijski mogu nastati cijepanjem proteinskih sljedova odgovarajućom proteazom (npr. tripsinom) i modelira izgled MS2 spektara takvih peptida [103]. Na temelju usporedbe eksperimentalno dobivenih MS2 spektara s teorijskim spektrima određuje se za koji peptid je najveća vjerojatnost da odgovara pojedinom eksperimentalnom MS2 spektru (engl. *peptide-spectrum match*, PSM). Vjerojatnost može biti vrlo visoka, ukoliko spektar vrlo dobro odgovara samo jednom peptidu ili relativno niska ukoliko za jedan eksperimentalni spektar postoji više kandidata. Isti peptid može biti identificiran na temelju nekoliko PSM-ova, što povećava vjerojatnost da je ispravno identificiran. Međutim, i loše poklapanje između teorijskog i eksperimentalnog spektra rezultira „identifikacijom“. Upravo zbog toga, nakon

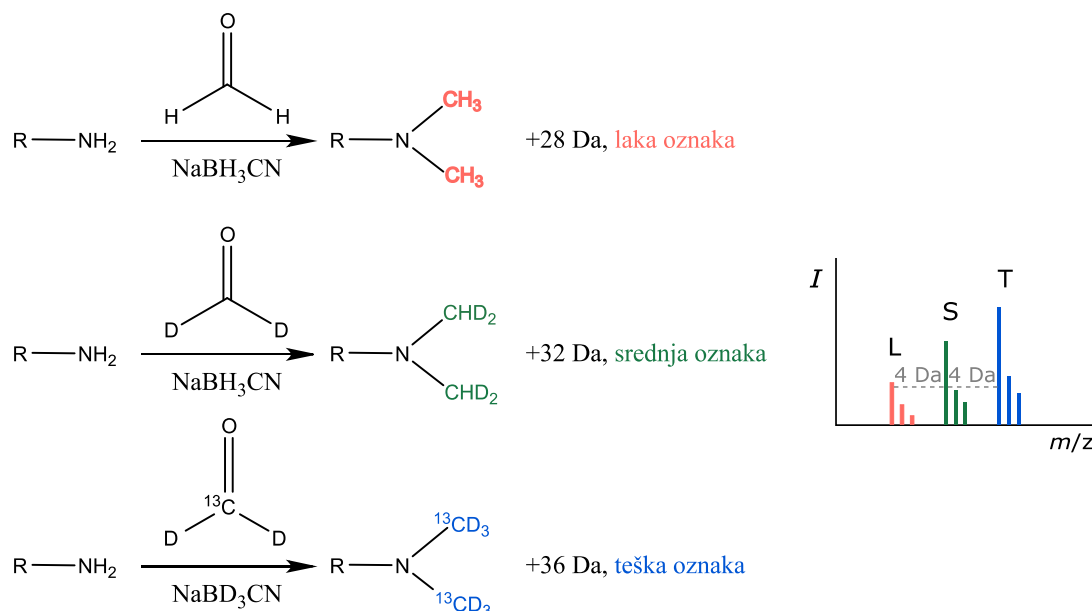
identifikacije peptida potrebno je provesti njihovu validaciju tako da se procijeni udio lažnih pozitiva. Uz pravu bazu podataka, programi za procesiranje podataka stoga generiraju i lažnu bazu podataka (engl. *decoy database*) obrtanjem ili miješanjem redosljeda aminokiselina u peptidima iz prave baze podataka. Uz uporabu lažne baze podataka moguće je procijeniti udio lažnih pozitiva (engl. *false discovery rate*, FDR) u identificiranim proteinima te izdvojiti set podataka s manjim ili većim FDR-om za daljnju analizu.

#### 2.4.5. Kvantitativna proteomika

Kako bi se kvantificirala količina peptida, a time i proteina u uzorku, u spektrometriji masa koriste se različite tehnike kvantifikacije. Promatramo li jedan peptid, njegov MS1 spektar kontinuirano se snima tijekom izlaska s kromatografske kolone. Površina signala ispod krivulje takvog kromatografskog signala koristi se za određivanje količine tog peptida, a iz toga i odgovarajućeg proteina u uzorku [103]. Ovakva vrste kvantifikacije naziva se kvantifikacija bez izotopne oznake (engl. *label-free quantification*, LFQ). Međutim, moguće je raditi i kvantifikaciju s različitim izotopno obilježenim reagensima na temelju MS1 ili MS2 spektra. Kvantifikacija na temelju MS1 spektra temelji se na tome da se u uzorku peptida koji se nanosi na LC-MS/MS nalaze različito izotopno označeni peptidi. Najkorišteniji oblik kvantifikacije na temelju MS1 spektra je stabilno izotopno označavanje s aminokiselinama u staničnoj kulturi (engl. *stable isotope labelling with amino acids in cell culture*, SILAC). Stanice koje rastu u različitim uvjetima (npr. u kontrolnim i tretiranim uvjetima) nalaze se u mediju s odgovarajućom izotopno označenom aminokiselinom (obično lizin ili arginin). Tijekom uzgoja, stanice ugrađuju aminokiselinu odgovarajućeg izotopnog sastava u svoj proteom. Izolirani proteomski ekstrakti s različitim izotopnim oznakama mogu se pomiješati i zatim zajedno pripremiti za proteolitičku razgradnju. Miješanjem proteina iz različitih uzoraka i zajednička analiza na LC-MS/MS metodom smanjuje varijaciju uslijed varijabilnosti kromatografije, procesa ionizacije i sl. U ovoj doktorskoj disertaciji korišteno je izotopno obilježavanje peptida metilnim skupinama (engl. *dimethyl-labelling*, DML). Za razliku od SILAC-a koji koristi metaboličko izotopno obilježavanje, DML je metoda kemijskog obilježavanja peptida. Peptidi se izotopno označavaju u reakciji s izotopno obilježenim formaldehidom i  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  [113]. Peptidi koji potječu iz različitih uzoraka označavaju se s dvije lake ( $\text{CH}_3^-$ ), srednje ( $\text{CHD}_2^-$ ) odnosno teške ( $\text{CD}_3^-$ ) metilne skupine na aminoskupinama (bočni ogranak lizina i N-kraj peptida) i zatim miješaju u omjeru 1:1:1 (slika 17). Smjesa peptida zatim se zajedno analizira LC-MS/MS metodom. Isti peptid koji je izotopno označen na tri različita načina daje tri signala



u MS1 spektru. Prema tome, analiza tri proteoma odjednom značajno povećava kompleksnost MS1 spektra, otežava identifikaciju peptida i povećava šum u podacima. Upravo zbog toga razvijene su metode kvantifikacije na temelju MS2 spektara koje se temelje na tome da se peptidi iz različitih uzoraka označavaju s različitim privjescima koji imaju istu masu, ali različitu raspodjelu izotopa unutar privjeska.



**Slika 17. Shema izotopnog obilježavanja peptida metilnim skupinama.** Peptidi se označavaju na aminoskupinama uz uporabu odgovarajuće kombinacije izotopno označenog formaldehida i NaBH<sub>3</sub>CN (lijevo). Različito izotopno označeni peptidi miješaju se u omjeru 1:1:1 i analiziraju spektrometrijom masa. Istovjetan peptid izotopno označen lakom, srednjom i teškom oznakom daje tri signala u MS1 spektru (desno). Slika je napravljena u programima *ChemDraw Ultra 12.0* i *Inkscape*.

Tijekom fragmentacije u ćeliji za fragmentaciju različiti privjesci će fragmentirati tako da daju različite signale u MS2 spektru (pri nižim  $m/z$  vrijednostima) i na taj način omogućavaju kvantifikaciju na temelju signala u MS2 spektru, pri čemu ne povećavaju kompleksnost MS1 spektara. Metode kvantifikacije temeljene na MS2 spektru uključuju izobarne privjeske iTRAQ (engl. *isobaric tags for relative and absolute quantitation*, izobarne oznake za relativnu i apsolutnu kvantifikaciju) i TMT (engl. *tandem mass tag*, tandemni maseni privjesak). Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om se u jednom mjerenju može analizirati do 18 različitih proteoma koji potječu iz stanica uzgojenih u različitim uvjetima. TMT i iTRAQ, uz DML i SILAC spadaju u metode relativne kvantifikacije proteina u različitim uvjetima koje se u proteomskim istraživanjima koriste puno češće od metoda apsolutne kvantifikacije.

#### 2.4.6. Primjena spektrometrije masa u detekciji supstitucije aminokiselina

Razvoj spektrometrije masa omogućio je detekciju i mjerenje razine mistranslacije u proteomu stanice. Pritom se može raditi MS/MS analiza modelnih proteina ili analize ukupnog proteoma [114]. MS/MS analiza modelnih proteina smanjuje kompleksnost MS spektara, povećava vjerojatnost detekcije mistranslatiranih peptida i reproducibilnost mjerenja. Ovakav pristup omogućava identifikaciju i kvantifikaciju širokog spektra aminokiselinskih supstitucija u jednom proteinu. Međutim, translacija pojedinog proteina nije reprezentativna za cjelokupnu translaciju u stanici jer se različite molekule mRNA razlikuju prema količini unutar stanice kao i brzini kojom se transliraju. Nadalje, jedan protein u pravilu nije kodiran sa 61 vrstom kodona ovakav pristup određivanja razine mistranslacije uzrokuje gubitak na širini različitih konteksta u kojima se mistranslacija događa, a poznato je da okolina pojedinog kodona može utjecati na razinu mistranslacije [1]. Gomez i suradnici iskoristili su ovakav pristup kako bi detektirali zamjenu leucina kodiranog CUG kodonom sa serinom u *C. albicans* [87]. Međutim, naknadno je globalnom proteomskom analizom pokazano da je navedena mistranslacija upitna [89]. Yu i suradnici su ovakvim pristupom dokazali ugradnju asparagina na pozicijama serina u IgG antitijelu [115]. Detekcija i kvantifikacija aminokiselinskih supstitucija u stanici može se provesti MS/MS analizom cijelog proteoma. Mordret i suradnici prvi su sustavno i globalno analizirali mistranslaciju na razini cijelog proteoma bakterije *E. coli* i jednostaničnog eukariota *S. cerevisiae* [1].

Dva su načina kvantifikacije ugradnje nepripadne aminokiseline na odgovarajuća mjesta u proteomu stanice. Jedan je određivanje omjera intenziteta mistranslatiranog peptida i zbroja intenziteta mistranslatiranog i nemistranslatiranog peptida [1, 115]. Drugi je metoda brojanja spektara [8, 11] gdje se određuje omjer broja PSM-ova mistranslatiranih peptida i ukupnog broja PSM-ova mistranslatiranog i nemistranslatiranog peptida. Obje metode imaju svoje prednosti i mane. Brojanje spektara uzima u obzir samo peptide za koje postoji MS2 spektar, što znači da je intrinzično naklonjeno visoko zastupljenim peptidima koji potječu iz visoko zastupljenih proteina. S druge strane, izračun razine mistranslacije preko omjera intenziteta uzima u obzir raspon peptida šireg dinamičkog raspona. Međutim, s obzirom da je mistranslatirani peptid prisutan u manjoj količini od nemistranslatiranog, onda je i njegov intenzitet na donjoj granici detekcije instrumenta što smanjuje točnost mjerenja.

## 2.5. Šaperonski sustavi u bakteriji *Escherichia coli*

### 2.5.1. Uloga šaperona u ispravnom smatanju proteina

Polipeptidni lanac nastao tijekom biosinteze proteina na ribosomu može poprimiti mnogo različitih konformacija. Proces smatanja je intrinzično sklon pogreškama jer većina konformacija koje polipeptidni lanac može poprimiti nije funkcionalna [116]. Osim toga, tijekom smatanja većih proteina ( $\geq 100$  aminokiselina) nastaju djelomično smotani intermedijeri koji imaju izložene dijelove s nepolarnim aminokiselinama i skloniji su agregaciji [15]. Uloga šaperona je vezati se na izložene nepolarne aminokiseline djelomično smotanih proteina i spriječiti njihovu međusobnu interakciju.

Šaperon (franc. *chaperon* - pratitelj, zaštitnik) je protein koji interagira s drugim proteinom pomažući mu u smatanju, a da pritom nije dio njegove finalne strukture [117]. Ekspresija mnogih šaperona inducirana je povišenom temperaturom, zbog čega se imenuju kraticom Hsp (engl. *heat-shock protein*) i brojem koji označava njihovu molekularnu masu u kilodaltonima [18]. U različitim organizmima mogu se naći različiti homolozi šaperona: Hsp40 (bakterijski DnaJ), Hsp60 (bakterijski GroEL), Hsp70 (bakterijski DnaK), Hsp90 (bakterijski HtpG), Hsp100 i sHsp (engl. *small Hsp* – mali Hsp).

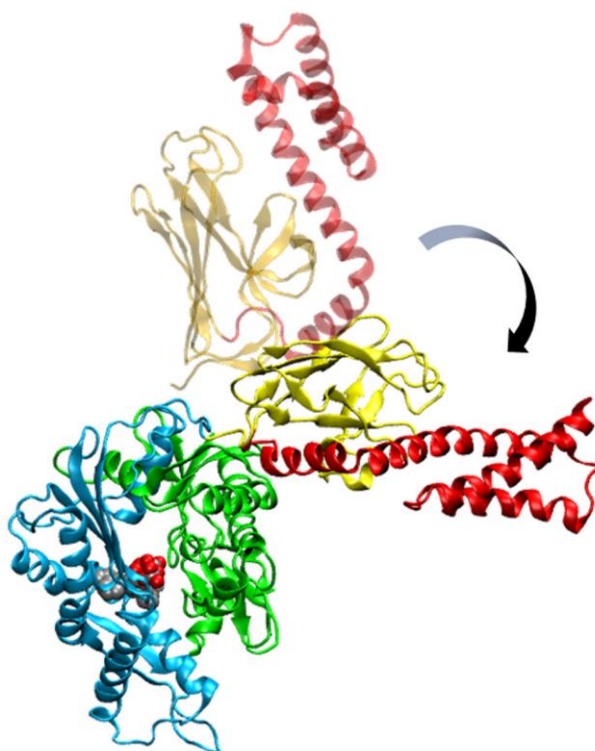
Šaperoni mogu interagirati s polipeptidnim lancem tijekom njegove sinteze (kotranslacijski), nakon sinteze (posttranslacijski) i u procesu ponovnog smatanja, ukoliko je odgovarajući protein poprimio pogrešnu 3D strukturu [118]. Osim toga, pomažu u sklapanju većih makromolekularnih kompleksa, transportu i degradaciji proteina, disocijaciji agregata i ispravnom smatanju denaturiranih proteina [18].

Šaperoni su podijeljeni u različite grupe na temelju homologije. Oni koji su prisutni u širokom rasponu organizama (kanonski ili temeljni šaperoni) često koriste ATP i prepoznaju sljedove nepolarnih aminokiselina prisutnih u unutrašnjosti proteina. Osim njih, stanica sadrži i redoks aktivne šaperone koji se aktiviraju pojavom određenog signala iz okoline [119]. Unutar bakterija razlikujemo nekoliko različitih kanonskih šaperona: protein TF (engl. *trigger factor*), DnaK (Hsp70)/DnaJ (Hsp40)/GrpE i šaperonin GroES/EL (Hsp60/Hsp10).

### 2.5.2. Šaperonski sustav DnaK/DnaJ/GrpE

Protein DnaK je predstavnik proteina Hsp70 u bakteriji *E. coli*. Zajedno s proteinima DnaJ i GrpE čini centralni šaperonski sustav s najviše proteinskih interaktora [17]. DnaK ima ulogu u smatanju proteina *de novo*, ponovnom smatanju krivo smotanih proteina i proteinskih agregata,

transportu proteina, njihovoj translokaciji kroz membranu i razgradnji. Protein DnaK je monomer koji se sastoji od N- i C-terminalne domene (slika 18).



**Slika 18. Shematski prikaz prelaska zatvorene (prozirno) u otvorenu konformaciju proteina DnaK.** Vezanje ATP-a u N-terminalnoj domeni stabilizira otvorenu konformaciju DnaK, a hidroliza ATP-a prelazak u zatvorenu konformaciju. Plavom i zelenom bojom označena je N-terminalna domena, a žutom i crvenom C-terminalna domena. Molekula ATP-a naznačena je kalotnim modelom. Preuzeto iz ref. [120].

N-terminalna domena veže i hidrolizira ATP, dok C-terminalna domena veže supstrat. Dvije domene povezane su fleksibilnom omčom sastavljenom većinom od nepolarnih aminokiselina čiji redosljed je sačuvan u porodici Hsp70 proteina. Omča omogućuje prijenos alosteričkog signala. Vezanje i hidroliza ATP-a u N-terminalnoj domeni regulira vezanje i otpuštanje supstrata u C-terminalnoj domeni. Stoga DnaK može postojati u dvije konformacije – otvorenoj i zatvorenoj (slika 18). C-terminalna domena šaperona DnaK sastoji se od nekoliko  $\alpha$ -zavojnica i dviju  $\beta$ -ploča između kojih se veže supstrat kao linearni polipeptid. Navedene  $\alpha$ -zavojnice su pokretljive i čine „poklopac“ koji se može spustiti tijekom vezanja i podignuti tijekom otpuštanja supstrata (slika 18) [120].

Košaperoni DnaJ i GrpE pomažu u regulaciji reakcijskog ciklusa šaperona DnaK. DnaJ se veže na izložene hidrofobne regije krivo smotanih ili denaturiranih proteina i na taj način sprječava njihovu agregaciju (djeluje kao protein držač, engl. *holdase*). Nakon što veže supstrat DnaJ ga predaje šaperonu DnaK tako da se veže na njegovu N-terminalnu domenu i fleksibilnu spojnicu. Ta interakcija snažno stimulira hidrolizu ATP-a na proteinu DnaK što rezultira

spuštanjem  $\alpha$ -poklopca u C-terminalnoj domeni i čvrstim vezanjem supstrata na DnaK. Zamjenu nastalog ADP-a s novom molekulom ATP-a provodi protein GrpE koji djeluje kao izmjenjivač nukleotida (engl. *nucleotide exchange factor*) što rezultira prelaskom DnaK u otvorenu konformaciju i otpuštanjem supstrata čime se omogućava ponovno započinjanje ciklusa.

### 2.5.3. Utjecaj mistranslacije na regulaciju ekspresije šaperona

Mistranslacija uzrokuje nastanak proteina koji nemaju genetički kodiran slijed aminokiselina i prema tome u pravilu nemaju optimalnu funkciju. Logično je pretpostaviti da će zamjena pojedine aminokiseline u proteomu stanice izazvati probleme sa smatanjem i agregacijom proteina. Osim toga, mistranslacija mijenja fleksibilnost proteina [83] i stoga može uzrokovati njihovo otvaranje i izloženost hidrofobnih regija koje mogu interagirati sa šaperonima.

Pojedine vrste mistranslacije uzrokovane bilo pogreškom u radu aminoacil-tRNA-sintetaza ili ribosoma, uzrokuju povećanu količinu transkripata glavnih šaperona u bakteriji *E. coli*: DnaK i GroEL [16, 23, 121]. Povećana ekspresija šaperona uslijed mistranslacije povećava otpornost organizma na povišenu temperaturu u bakteriji *E. coli* i u kvascu [23, 122]. Osim jednostaničnih organizama, povećana razina agregacije i ekspresije različitih šaperona primijećena je i u neuronima miša uslijed Ala  $\rightarrow$  Ser mistranslacije [67].

Unatoč tome što mistranslacija u pravilu izaziva stres za stanicu, u bakteriji *E. coli* Ala  $\rightarrow$  Ser mistranslacija nema povećanu ekspresiju šaperona [21]. Za razliku od klasične slike da mistranslacija uvijek uzrokuje povišenje broja šaperona u stanici, nedavno je otkriveno da u kvascu mistranslacija na alaninskim pozicijama u proteomu smanjuje ekspresiju šaperona [26]. Smanjeni broj šaperona povećava osjetljivost kvasca na povišenje temperature.

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Standardne krute kemikalije

Agaroz standardna ROTI®Garoz za DNA/RNA elektroforezu (*Carl Roth*), amonijev bikarbonat *BioUltra*, > 99.5 % (*Sigma Aldrich*), amonijev persulfat p.a. (*Serva*), 1 x *cOmplete™*, *Mini*, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (*Roche*), D(+)-glukoza bezvodna p.a. (*Gram-mol*), di-kalij-dihidrogenfosfat bezvodni p.a. (*Kemika*), 1,4-ditiotreitol  $\geq 99$  % p.a. (*Carl Roth*), fenilmetilsulfonil-fluorid >99 % (P7626, *Sigma*), fenol 99,5 % *extra pure, loose crystals unstabilised* (*Thermo Scientific*), gvanidinijev klorid (*Itrij*), jodoacetamid (I1149, *Sigma*), kalcijev klorid p.a. (*Merck-Alkaloid*), kalij hidroksid zrnca 2-5 mm p.a. (*Kemika*), kalij-klorid (*Kemika*),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. (*Gram-mol*), kompleksal® III (etilendiamintetraoctena kiselina – dinatrijeva sol) (dihidrat) p.a. (*Kemika*), magnezij-sulfat-heptahidrat (*Kemika*), natrij-hidrogenfosfat bezvodni p.a. (*Kemika*), natrij-dihidrogenfosfat-dihidrat p.a. (*Kemika*), NaCl p.a. (*Gram-mol*), NaOH *pellets* (*Carlo Erba*), natrijev acetat bezvodni p.a. (*Gram-mol*), natrijev cijanoborhidrid, *reagent grade 95 %* (156159, *Aldrich*), natrijev citrat dihidrat p.a. (*Kemika*), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) >99% (*Sigma*), polietilen-glikol prosječne molekulske mase 8000 (P2139, *Sigma*), SDS *ultrapure* (*Carl Roth*), Tris baza (*Th. Geyer*), Tween® 20 (P7949, *Sigma-Aldrich*), urea (*Gram-mol*), tiourea *ReagentPlus > 99 %* (*Sigma Aldrich*)

#### 3.1.2. Standardne tekuće kemikalije

96 % etilni alkohol (*Lab Expert*), formaldehid, otopina min. 36 % stabilizirana s maks. 7 % metanola p.a. (T.T.T.), fosforna kiselina min 85 % p.a. (T.T.T.), glicerol redestiliran p.a. (*Gram-mol*), KCl 3 mol/L otopina (KS110, *Radiometer analytical*), kloridna kiselina 37 %-tna p.a. (*Gram-mol*), kloroform (*Carlo Erba*), ledena octena kiselina 99-100 % p.a. (*LabExpert*), 2-merkaptetanol (M3148, *Sigma*), metanol p.a. (*Gram-mol*), puferske otopine pH 4,01; 7,00 i 9,21 (*Mettler Toledo*), ROTIPHORESE® Gel 40 (29:1) (*Carl Roth*), trifluoroctena kiselina  $\geq 99,5$  % (*Fisher Chemical*)

### 3.1.3. Antibiotici

Ampicilin natrijeva sol (A9518, *Sigma-Aldrich*), kanamicin sulfat p.a. (*Gibco BRL*), kloramfenikol (C0378, *Sigma*), tetraciklin hidroklorid (T3383, *Sigma*)

### 3.1.4. Aminokiseline i nukleotidi

Glicin (*Carlo Erba*), L-izoleucin (58879, *Sigma*), L-leucin (61819, *Sigma*), L-norvalin (N7627, *Sigma*), L-valin (94619, *Sigma*)

### 3.1.5. Organske boje

*Brilliant Blue R* (27816, *Sigma Aldrich*), bromfenolplavo (*Serva*), etidijev bromid (*Boehringer Mannheim*), *Coomassie® Brilliant blau G250* (*Merck*), ksilencijanolo fluorofosfat (*Serva*)

### 3.1.6. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Apiraza iz krumpira, ATP-aza  $\geq 200$  U/mg protein, liofilizirani prah (A6535, *Sigma-Aldrich*), goveđi serumski albumin *Fraction V*,  $\geq 98\%$  (*Boehringer Mannheim*), lizozim iz kokošnjeg bjelanjka,  $\geq 40\ 000$  U/mg (L6876, *Sigma*), *Lysonase™ Bioprocessing Reagent* (71230, *Novagen*), *rLysC Mass Spec Grade* (V1671, *Promega*), ribonukleaza A iz goveđe gušterače, 50-150 Kunitz U/mg (R5000, *Sigma*), *Taq-DNA-polimeraza*, rekombinantna (EP0404, *Thermo Scientific*), *Sequencing Grade Modified Trypsin*, smrznuti (V511C, *Promega*)

### 3.1.7. Materijal za kromatografiju

Ni-NTA agarozna (*Protino*), *C18 Solid Phase Extraction Disks* (*Empore*)

### 3.1.8. Elektroforetski standardi

*Precision Plus Protein™ Standards Unstained* (# 161-0363 *Bio-Rad*), *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*)

### 3.1.9. Kemikalije za pripremu otopala za spektrometriju masa

Acetonitril za LC/MS (*Carlo Erba*), mravlja kiselina *puriss.p.a.*  $\geq 98\%$  (*Honeywell Fluka*), voda za LC/MS (*Carlo Erba*)

### 3.1.10. Izotopni reagensi za izotopno obilježavanje peptida na čvrstoj fazi

Formaldehid-d<sub>2</sub>, otopina ~20 % mase u D<sub>2</sub>O, 98 % atoma D (492620, Aldrich), formaldehid-<sup>13</sup>C, d<sub>2</sub>, otopina ~20 % mase u D<sub>2</sub>O, 98 % atoma D, ≥ 99 % atoma <sup>13</sup>C (596388, Aldrich), natrijev cijanobordeuterid, 96 % atom D, 98 % CP (190020, Aldrich)

### 3.1.11. Komercijalni kompleti

BugBuster® Protein Extraction Reagent (Merck), komplet za bojanje srebrom PlusOne™ Silver Staining Kit (Amersham Biosciences), komplet za pročišćavanje produkata PCR-a QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)

### 3.1.12. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterije *E. coli*

Agar za bakteriološku upotrebu (Liofilchem), Difco™ M9 Minimal Salts, 5 x (Becton, Dickinson and Company), LB agar (Liofilchem), kvašćev ekstrakt (Liofilchem), tripton (Liofilchem).

#### 3.1.12.1. Tekući i kruti hranjivi mediji

U eksperimentima su korišteni tekući hranjivi mediji čiji je sastav naveden u tablici 2. Za pripremu hranjivih podloga korišten je LB agar ili medij u koji je dodan agar ( $\gamma = 15$  g/L).

Tablica 2. Sastav hranjivih medija za uzgoj bakterije *Escherichia coli*.

Naziv medija	Sastav
LB medij	10 g/L tripton,
	5 g/L kvašćev ekstrakt,
	10 g/L NaCl
M9 medij	1x M9 soli (6,8 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,
	3,0 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,50 g/L NaCl,
	1,0 g/L NH <sub>4</sub> Cl),
	D-glukoza ( $\gamma = 4$ g/L),
	2 mmol/L MgSO <sub>4</sub> ,
0,1 mmol/L CaCl <sub>2</sub> ,	
M9* medij	1x M9 soli,
	D-glukoza ( $\gamma = 4$ g/L),
	2 mmol/L MgSO <sub>4</sub> ,
	0,1 mmol/L CaCl <sub>2</sub> ,
	100 $\mu$ mol/L L-Ile, 100 $\mu$ mol/L
L-Leu, 100 $\mu$ mol/L L-Val	



### 3.1.13. Sojevi bakterije *Escherichia coli*

Genotip i opis sojeva bakterije *E. coli* korištenih u eksperimentima nalazi se u tablici 3.

**Tablica 3. Opis sojeva bakterije *E. coli* korištenih u eksperimentima.** Podebljan je dio genotipa po kojemu se pojedini soj razlikuje od laboratorijskog soja MG1655.

NAZIV	GENOTIP	OPIS	REF.
<b>MG1655</b>	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1</i>	Laboratorijski soj bakterije <i>E. coli</i> najbliži divljem tipu.	[123]
<b>PS7066</b>	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1 ileS10Ala</i>	Derivat soja MG1655 koji na pozicijama 241-250 u <i>ileS</i> sadrži 10 tripleta GCG koji kodiraju aminokiselinu alanin. Navedene mutacije deaktiviraju hidrolitičku aktivnost u domeni za popravak pogreške IleRS.	[25]
<b>PS7068</b>	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1 ΔilvG-E</i>	Derivat soja MG1655 s deletiranim <i>ilvG</i> i <i>ilvE</i> te regijom između njih koja uključuje <i>ilvM</i> .	[25]
<b>JW5807-2</b>	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1 ΔleuB::kan<sup>R</sup></i>	Derivat soja MG1655 iz kolekcije Keio koji umjesto <i>leuB</i> sadrži kanamicinsku kazetu okruženu FRT mjestima.	[124]
<b>CAG18431</b>	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1 ilv-500::Tn10</i>	Derivat soja MG1655 kod kojeg je <i>ilvD</i> deaktiviran insercijom transpozona Tn10 unutar koje se nalazi gen za otpornost na tetraciklin.	[125] [126]
<b>ED<sup>-</sup></b>	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1 ribF-kan<sup>R</sup>- ileS T243R/D342A</i>	Derivat soja MG1655 koji sadrži kanamicinsku kazetu okruženu FRT mjestima između <i>ribF</i> i <i>ileS</i> te mutacije T243R i D342A u <i>ileS</i> . Navedene mutacije deaktiviraju hidrolitičku aktivnost u domeni za popravak pogreške IleRS.	[127]
<b>ED<sup>-</sup> dnaK_His</b>	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1 dnaK_His6-FRT-dnaJ ribF-kan<sup>R</sup>- ileST243R/D342A</i>	Derivat soja MG1655 koji na C-kraju <i>dnaK</i> sadrži nukleotidni slijed koji kodira histidinski privjesak - Gly <sub>2</sub> His <sub>6</sub> , FRT mjesto između <i>dnaK</i> i <i>dnaJ</i> , kanamicinsku kazetu okruženu FRT mjestima između <i>ribF</i> i <i>ileS</i> te mutacije T243R i D342A u <i>ileS</i> .	[127]

### 3.1.14. Bakteriofag P1 za transdukciju

Bakteriofag P1<sub>vir</sub> korišten za transdukciju bakteriofagom P1 dobiven je od prof. dr. sc. Ivane Ivančić-Baće.

### 3.1.15. Plazmidi za transformaciju bakterije *Escherichia coli*

Za FLP-FRT rekombinaciju korišten je plazmid pCP20 veličine 9497 pb koji sadrži gen *flp* koji kodira rekombinazu Flp iz kvasca, gene za otpornost na ampicilin i kloramfenikol te temperaturno osjetljivo ishodište replikacije *repA101(ts)* [128].

### 3.1.16. Standardne kemikalije za lančanu reakciju polimerazom

dNTP mix, 10 mM each (*Thermo Scientific*), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (*Thermo Scientific*), 10x Taq pufer s (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*Thermo Scientific*)

### 3.1.17. Početnice za lančanu reakciju polimerazom

Popis početnica korištenih u eksperimentima nalazi se u tablici 4.

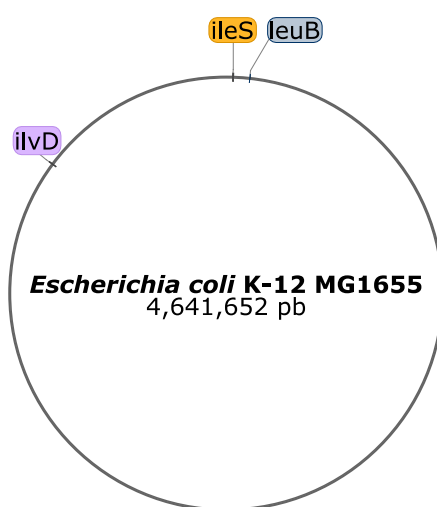
**Tablica 4.** Popis početnica korištenih za lančanu reakciju polimerazom.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' → 3')
leuB_F	CGAAAACAACAAGGAAACCGTG
leuB_R	GCCATGATTACACCCCTTCTG
k1_R	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
k2_F	TTGTCAAGACCGACCTGTCC
ilvD_F	GTATGCCTAAGTACCGTTCC
ilvD_R	GTTTCGATTTATCGCGCACC
Tn10	GTTCGCACATCTTGTTGTCTG
ribF_F	GCGCGTGATGAATTAACC
ileS_R	GGAAACAGGGTTCCCGAT
ileS_ed_seq_F	TCCATCGACGTTGCTTTCC
ileS_ed_seq_R	GATGTCGTTTCGCTTTGAAGAC

## 3.2. Konstrukcija sojeva bakterije *Escherichia coli*

### 3.2.1. Opis pripreme sojeva

Za praćenje mistranslacije, potrebno je konstruirati auksotrofni soj koji ne može sintetizirati izoleucin, leucin, valin ni norvalin te koji sadrži dvije mutacije u domeni za popravak pogreške IleRS (T243R i D342A) koje deaktiviraju njezinu hidrolitičku aktivnost [8]. Auksotrofija se postiže inaktivacijom dvaju gena: *ilvD* i *leuB*. Shema genoma *E. coli* s naznačenim genima koji se mijenjaju naznačena je na slici 19. Tijekom konstrukcije soja s navedenim karakteristikama korišteni su sojevi JW5807-2, CAG18431 i ED<sup>-</sup> (tablica 3).



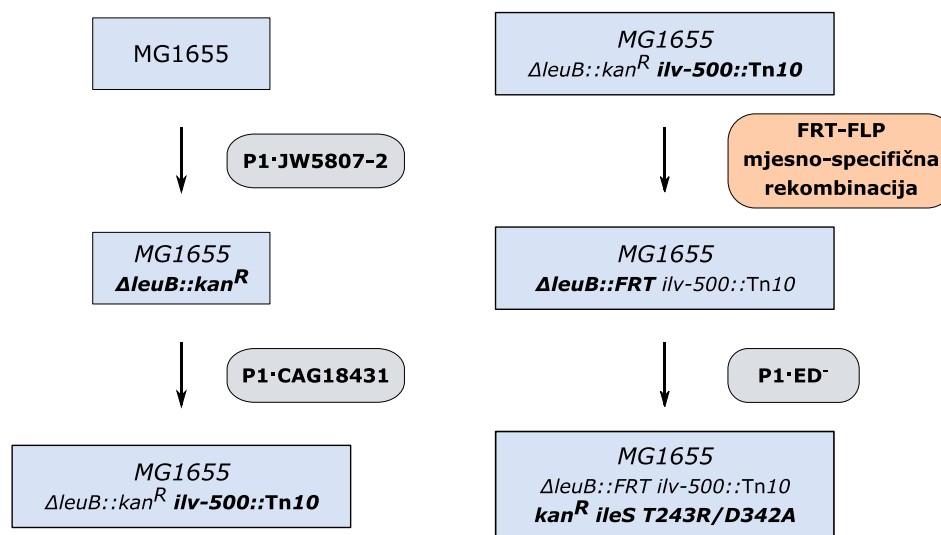
**Slika 19.** Shema genoma bakterije *Escherichia coli* K-12 MG1655 (pristupni kôd: U00096.3). Naznačene su pozicije *ileS* (22 391 → 25 207), *leuB* (80 867 ← 81 958) i *ilvD* (3 953 478 → 3 955 328). Shema je napravljena u programu *SnapGene*<sup>®</sup>.

U postupku konstrukcije auksotrofnog soja s mutacijama u domeni za popravak pogreške IleRS korištene su dvije metode genetičkog inženjerstva: transdukcija bakteriofagom P1 i FRT-FLP mjesno-specifična rekombinacija. Transdukcija bakteriofagom P1 je metoda kojom se uz uporabu bakterijskog virusa P1 prenosi dio genetičkog materijala iz jednog soja u drugi [27]. Konkretno, bakteriofag P1 tijekom svog rasta umjesto svog genoma može ugraditi fragment genoma bakterije domaćina veličine oko 100 kpb. Virusne čestice sa željenim fragmentima genoma iz jednog bakterijskog soja (donora) mogu se koristiti za infekciju drugog bakterijskog soja (recipijenta) pri čemu se DNA homolognom rekombinacijom ugrađuje u genom drugog soja. Ukoliko fragment genoma koji se prenosi sadrži i gen za otpornost na antibiotik, konačni soj moguće je izolirati na hranjivim pločama s odgovarajućim antibiotikom.

FRT-FLP mjesno-specifična rekombinacija je postupak kojim se iz genoma *E. coli* rekombinacijom između kratkih homologija (mjesto FRT) izgradnjom gubi gen za otpornost na

antibiotik koji se nalazi između dva FRT (engl. *flippase recognition target*) mjesta [129]. Bakterijski soj iz kojeg se želi izgraditi otpornost na antibiotik se transformira s plazmidom pCP20 koji među ostalim sadrži gen za flipazu (rekombinazu Flp, enzim koji prepoznaje FRT mjesta) pod termoinducibilnim promotorom, gen za otpornost na kloramfenikol i termosenzitivno ishodište replikacije. Povišenjem temperature na 42 °C, aktivira se ekspresija flipaze čime se potiče homologna rekombinacija između susjednih FRT mjesta i izgradnja gena za otpornost na antibiotik te ujedno i gubitak plazmida.

Soj JW5807-2 ( $\Delta leuB::kan^R$ ) umjesto *leuB* sadrži gen za otpornost na kanamicin okružen FRT mjestima, a soj CAG18432 (*ilv-500::Tn10*) unutar *ilvD* ima umetnutu sekvencu transpozona *Tn10*. Kako bi se dio genoma sa željenom mutacijom prebacio u soj MG1655 korištena je transdukcija bakteriofagom P1 kojom se najprije prebacuje dio genoma iz soja JW5807-2, a zatim iz soja CAG18432 (slika 20, potpoglavlje 3.2.2). Željeni mutanti s uvedenom mutacijom izoliraju se na LB pločama s odgovarajućim antibiotikom (u slučaju JW5807-2 – kanamicin, a u slučaj u CAG18431 tetraciklin). Otpornost na kanamicin izgrađuje se FRT-FLP mjesno-specifičnom rekombinacijom čime na mjestu *leuB* gena ostaje FRT ožiljak (slika 20, potpoglavlje 3.2.3). U dobiveni soj MG1655  $\Delta leuB::FRT ilv-500::Tn10$  transdukcijom bakteriofagom P1 (potpoglavlje 3.2.2) ugrađuje se dio genoma iz soja MG1655 *kan<sup>R</sup> ileS T243R/D342A* koji sadrži otpornost na kanamicin uzvodno od gena za IleRS s dvostrukom točkastom mutacijom (slika 20). Na taj način dobiven je mistranslatirajući auktrotrofni soj: MG1655 *kan<sup>R</sup> ileS T243R/D342A  $\Delta leuB::FRT ilv-500::Tn10$* .



**Slika 20. Shema konstrukcije bakterijskih sojeva.** Kraj strelice je naznačena vrsta metode koja je korištena za konstrukciju pojedinog soja. Kod transdukcije bakteriofagom P1 naznačeni su donorski sojevi: JW5807-2 ( $\Delta leuB::kan^R$ ), CAG18432 (*ilv-500::Tn10*) i ED<sup>-</sup> (*kan<sup>R</sup> ileS T243R/D342A*). U konstruiranim sojevima podebljan je dio genotipa koji se mijenja pojedinim korakom. Slika je napravljena u programu *Inkscape*.

Potvrda uvedenih mutacija utvrđuje se lančanom reakcijom polimerazom uz pomoć početnica koje okružuju mutirana mjesta u genomu i sekvenciranjem nastalih produkata.

### 3.2.2. Priprema bakteriofaga P1 i transdukcija

Transdukcija bakteriofagom P1 provedena je prema uputama iz Thomason *et al.* [27]. Kako bi se dio genoma bakterije *E. coli* veličine oko 100 kb prebacio iz soja donora u soj recipijent, potrebno je najprije pripremiti bakteriofag P1 za transdukciju (rastom u donorskom bakterijskom soju) i zatim njime provesti transdukciju u recipijentni soj.

#### 3.2.2.1. Priprema bakteriofaga P1 za transdukciju

Sterilan LB medij inokulira se donorskim bakterijskim sojem i uzgoji prekonoćna kultura na 37 °C i pri 250 rpm. Idući dan se u polipropilenskoj epruveti pripremi 5 mL sterilnog LB medija obogaćenog 0,2 %-tnom glukozom i CaCl<sub>2</sub> koncentracije 5 mmol/L te inokulira prekonoćnom kulturom donorskog soja u omjeru 1:100. Pripremljena kultura inkubira se na 37 °C uz protresanje (250 rpm) do vidljivog замуćenja (oko 1,5 h), nakon čega se doda 100 µL suspenzije bakteriofaga P1 *vir* titra 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> pfu mL<sup>-1</sup> (engl. *plaque-forming unit*). Kultura se zatim inkubira na 37 °C uz protresanje (250 rpm) dok ne postane bistra (oko 3 h) što je znak da je došlo do lize većine stanica. Kako bi se osigurala potpunost lize stanica, u bistru kulturu doda se 200 µL kloroforma i vorteksira 5 min. Kako bi se odijelio gornji vodeni sloj od donjeg kloroformskog sloja, smjesa se centrifugira 10 min na 9000 g pri 4 °C. Vodeni sloj koji sadrži bakteriofag P1 s ugrađenim fragmentima genoma donorskog soja pipetom se oprezno prebaci u mikroeprevetu i uskladišti na 4 °C do uporabe. Važno je da se u ovom koraku ne prenese i dio kloroforma koji tijekom vremena smanjuje titar faga.

#### 3.2.2.2. Transdukcija bakteriofagom P1

Sterilan LB medij inokulira se recipijentnim bakterijskim sojem i uzgoji prekonoćna kultura na 37 °C i pri 250 rpm. Idući dan se iz 3 mL prekonoćne kulture obore stanice centrifugiranjem 2 min na 16 000 g na sobnoj temperaturi. Talog stanica suspendira se u 1,5 mL otopine CaCl<sub>2</sub> (10 mmol/L) i MgSO<sub>4</sub> (5 mmol/L). Volumen otopine za suspenziju stanica određen je kao polovica volumena prekonoćne kulture iz koje su istaložene stanice. Suspenzija stanica se podijeli u alikvote od 100 µL u 4 mikroeprevete i pomiješa bakteriofagom P1 s fragmentima genoma donorskog soja (potpoglavlje 3.2.2.1) u sljedećim volumenima: 0 µL – uzorak 0; 1 µL – uzorak 1; 10 µL – uzorak 10; 100 µL – uzorak 100. Dobivene četiri suspenzije bakterijskih stanica

inkubiraju se 30 min na 37 °C radi infekcije recipijentnog soja bakteriofagom nakon čega im se doda 1 mL LB medija i natrijev citrat do konačne koncentracije 150 mmol/L. Citratni ioni kompleksiraju s ionima  $\text{Ca}^{2+}$  koji su bakteriofagu potrebni za infektivnost i na taj način zaustavljaju daljnju infekciju [27]. Stanice se inkubiraju 1 h na 37 °C uz protresanje (1000 rpm) nakon čega se obore centrifugiranjem 2 min na 16 000 g na sobnoj temperaturi. Talog stanica suspendira se u 50 µL sterilnog LB medija i nasadi na ploče s LB medijem, natrijevim citratom koncentracije 5 mmol/L (radi onemogućavanja infekcije rezidualnim bakteriofagom) i odgovarajućim antibiotikom (kanamicin koncentracije 30 µg mL<sup>-1</sup> ili tetraciklin koncentracije 5 µg/mL). Očekivani ishod je da na ploči s uzorkom 0 ne naraste nijedna kolonija, a da na ostalim pločama broj kolonija raste od uzorka 1 prema uzorku 100. S ploče na koju je nanoseno najmanje bakteriofaga P1 odaberu se po tri pojedinačne kolonije i razmažu na ploče s LB medijem, natrijevim citratom (5 mmol/L) i odgovarajućim antibiotikom (kanamicin koncentracije 30 µg/mL ili tetraciklin koncentracije 5 µg/mL) te inkubiraju na 37 °C preko noći. Postupak razmazivanja pojedinačnih kolonija se provede još jednom kako bi se maknuo rezidualni bakteriofag P1. Genotip dobivenog soja potvrdi se testiranje fenotipa na pločama s hranjivim medijem, lančanom reakcijom polimerazom i/ili sekvenciranjem.

### 3.2.3. FRT-FLP mjesno-specifična rekombinacija

Najprije se naprave elektrokompetentne stanice bakterijskog soja (potpoglavlje 2.2.4) koji u genomu sadrži gen za otpornost na kanamicin okružen FRT mjestima. Stanice se zatim transformiraju plazmidom pCP20 (potpoglavlje 3.2.5). Idući dan se s ploče na kojoj su narasle transformirane bakterije odabere pojedinačna kolonija, razmaže na ploču s LB medijem i uzgaja preko noći pri 42 °C radi indukcije ekspresije Flp rekombinaze i izbacivanja plazmida. Idući dan se s ploče odabere nekoliko pojedinačnih kolonija i redom razmažu na 3 ploče s LB medijem od kojih prva sadrži ampicilin koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup> (testiranje je li bakterija izgubila plazmid), druga kanamicin koncentracije 30 µg mL<sup>-1</sup> (testiranje uspješnosti FRT-FLP mjesno-specifične rekombinacije), a treća samo LB medij (jedina ploča na kojoj se očekuje rast bakterija ukoliko je postupak uspješan). Genotip dobivenog soja potvrdi se lančanom reakcijom polimerazom i/ili sekvenciranjem.

### 3.2.4. Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

Kako bi se pripremile elektrokompetentne stanice potrebno je najprije uzgojiti prekonoćnu kulturu željenog soja bakterije *E. coli* u LB mediju na 37 °C uz protresanje (250 rpm).

Uzgojenom prekonocnom kulturom inokulira se 10 mL sterilnog LB medija u omjeru 1:100, nakon čega se stanice uzgajaju na 37 °C i 250 rpm do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,5-0,8$ ). Dobivena baterijska kultura ohladi se 15-30 min na ledu, nakon čega se stanice obore centrifugiranjem 15 min na 4000 g pri 4 °C. Talog stanica ispere se najprije s 10 mL hladne sterilne  $ReH_2O$ , a zatim s 5 mL hladnog sterilnog glicerola ( $\varphi = 10\%$ ). Između ispiranja, stanice se obaraju centrifugiranjem 15 min na 4000 g pri 4 °C. Isprani talog stanica suspendira se u 0,5 mL hladnog sterilnog glicerola ( $\varphi = 10\%$ ), alikvotira po 40  $\mu L$  u sterilne mikroeprovete i pohrani na -80 °C do daljnje uporabe.

### 3.2.5. Transformacija stanica plazmidom pCP20

Alikvot elektrokompetentnih stanica pomiješa se s 50 ng plazmida pCP20 i prebaci u hladnu elektrokivetu debljine 2 mm. Pomoću hladnog plastičnog držača elektrokiveta se namjesti između elektroda u elektroporatoru i izazove električni puls s naponom od 2,5 kV u trajanju između 5 i 6 ms. U slučaju iskrenja postupak se ponavlja s manjom količinom plazmida. Nakon elektroporacije bakterije se suspendiraju u 800  $\mu L$  sterilnog LB medija i inkubiraju 1 h na 30 °C uz protresanje (1000 rpm). Važno je da temperatura uzgoja 30 °C jer plazmid pCP20 ima termosenzitivno ishodište replikacije. Volumen kulture od 20  $\mu L$  nasadi se na ploču s LB medijem i ampicilinom (100  $\mu g mL^{-1}$ ) na 30 °C preko noći.

### 3.2.6. Testiranje auksotrofije dobivenih sojeva na M9 pločama

Fenotip konstruiranih sojeva bakterije *E. coli* moguće je provjeriti na pločama s M9 medijem i pojedinom aminokiselinom. U tablici 5 prikazan je očekivan rast dobivenih sojeva na pojedinim pločama s M9 medijem. Nakon delecije *leuB* gena, *E. coli* više ne može rasti na mediju bez leucina. Auksotrof za aminokiseline s razgranatim bočnim ogrankom može rasti isključivo na ploči koja osim M9 medija sadrži izoleucin, leucin i valin.

**Tablica 5.** Očekivani rezultati testiranja rasta pojedinih sojeva bakterije *Escherichia coli* na pločama s M9 medijem uz dodatak različitih kombinacija aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom. Koncentracija pojedine aminokiseline je bila 250  $\mu\text{mol/L}$ .

Sastav hranjive ploče	MG1655	MG1655 $\Delta\text{leuB}::\text{kan}^R$	MG1655 ( $\Delta\text{leuB}::\text{kan}^R$ $\text{ilv-500:Tn10}$ )
M9	+	–	–
M9 + Ile + Val	+	–	–
M9 + Ile + Leu	+	+	–
M9 + Val + Leu	+	–	–
M9 + Ile + Leu + Val	+	+	+

### 3.2.7. Izolacija genomske DNA

Priredi se prekonocna kultura bakterijskog soja *E. coli* iz kojeg se želi izolirati genomska DNA. Idući dan stanice se obore centrifugiranjem 2 min na 16 000 g. Talog stanica ispere se s 1 mL pufera za lizu (25 mmol/L Tris/HCl, pH = 8; 10 mmol/L EDTA) i centrifugira 2 min na 16 000 g pri sobnoj temperaturi. Stanice se suspendiraju u 0,5 mL pufera za lizu i doda im se lizozim konačne koncentracije 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Smjesa se inkubira 30 min na sobnoj temperaturi i povremeno promiješa. Nastali lizat je viskozan zbog oslobođene genomske DNA. U smjesu se doda natrijev dodecil-sulfat (SDS) konačnog udjela 2 % i inkubira 5 min na 70 °C uz protresanje. Nastali lizat je bistar i viskozan. Smjesa se pomiješa s jednakim volumenom fenol-kloroforma i miješa okretanjem mikroepuvete radi odvajanja proteina i ekstrakcije genomske DNA u vodeni sloj. Slojevi se odvoje centrifugiranjem 15 min na 16 000 g. U vodenu fazu doda se natrijev acetat konačne koncentracije 300 mmol/L (pH = 5,2) i hladni etanol konačnog volumnog udjela 70 %. Smjesa se inkubira 10 min na ledu tijekom čega dolazi do nastanka bijelog pahuljastog taloga genomske DNA. Talog se izdvoji centrifugiranjem 10 min na 15 000 g, ispere s 0,5 mL etanola ( $\varphi = 70 \%$ ) i osuši. Nastali talog otopi se u 200  $\mu\text{L}$  TE pufera (10 mmol/L Tris/HCl, pH = 8-8,5; 1 mmol/L EDTA) uz dodatak RNaze A do konačne koncentracije 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Smjesa se inkubira 30 min na 37 °C uz protresanje, nakon čega joj se doda jednaki volumen fenol-kloroforma i promiješa polaganim okretanjem mikroepuvete radi ekstrakcije genomske DNA. Slojevi se odvoje 15 min na 16 000 g, nakon čega se u gornji vodeni sloj doda PEG 8000 konačne koncentracije 70 g/L i NaCl konačne koncentracije 500 mmol/L. Smjesa se promiješa i potom centrifugira 10 min na 16 000 g. Talog DNA ispere se s 0,5 mL etanola ( $\varphi = 70 \%$ ), osuši i otopi u 100  $\mu\text{L}$  pufera TE. Dobivenoj otopini genomske DNA odredi se



koncentracija na uređaju *NanoDrop*, a čistoća izolacije analizira agaroznom elektroforezom. Očekivani raspon koncentracija iznosi 100–700 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### 3.2.8. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) postupak je umnažanja slijeda DNA omeđenog dvjema početnicama – uzvodnom koja sjeda na 5' kraj slijeda i nizvodnom koja sjeda na 3' kraj. Kako bi se provjerio genotip na mjestu gena *leuB*, korištene su tri kombinacije početnica: *leuB\_F* i *leuB\_R*, *k2\_F* i *leuB\_R* odnosno *leuB\_F* i *k1\_R* (tablica 3). Početnica *k1\_R* slijedom nukletida odgovara početnici *k1* korištenom za konstrukciju sojeva bakterije *E. coli* iz Keio kolekcije [124, 129]. Očekivane veličine produkata u slučaju bakterija s intaktnim odnosno deaktiviranim *leuB* genom navedene su u tablici 6.

**Tablica 6.** Očekivane veličine produkata lančane reakcije polimerazom uz pojedini set početnica u sojevima bakterije *Escherichia coli* s različitim genotipom.

Kombinacija početnica	WT	$\Delta leuB:: kan^R$	$\Delta leuB:: FRT$	<i>ilv-500:: Tn10</i>	<i>kan<sup>R</sup>-ileS T243R/D342A</i>
<i>leuB_F</i> i <i>leuB_R</i>	1123 pb	1356 pb	133 pb	--	--
<i>leuB_F</i> i <i>k1_R</i>	--	524 pb	--	--	--
<i>k2_F</i> i <i>leuB_R</i>	--	760 pb	--	--	--
<i>ilvD_F</i> i Tn10	--	--	--	1181 pb	--
Tn10 i <i>ilvD_R</i>	--	--	--	894 pb	--
<i>ribF_F</i> i <i>ileS_R</i>	146 pb	--	--	--	1449 pb

Kako bi se provjerio genotip bakterije na mjestu *ilvD* gena, korištene su dvije kombinacije početnica: *ilvD\_F* i Tn10 odnosno Tn10 i *ilvD\_R* (tablica 6). Budući da transpozon 10 sadrži repetitivne sljedove na oba kraja sekvence, početnica Tn10 u prvom je slučaju nizvodna, a u drugom uzvodna početnica.

Kako bi se provjerio genotip bakterije na mjestu *ileS* gena korištene su početnice *ribF\_F* i *ileS\_R* (tablica 3). Smjesa za PCR za provjeru svih triju modificiranih gena sastavljena je od komponenti navedenih u tablici 7. Program za PCR namješten je prema tablici 8, a očekivane veličine produkata PCR-a navedene su u tablici 6.

**Tablica 7.** Sastav smjese za provjeru genotipa kontruiranih sojeva .

Komponenta	Količina u konačnoj smjesi
uzvodna početnica	1 $\mu\text{mol/L}$
nizvodna početnica	1 $\mu\text{mol/L}$
genomska DNA	20 ng
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mmol/L
Taq pufer	1 x
Smjesa dNTP-ova	0,2 mmol/L
Taq-polimeraza	0,025 U/ $\mu\text{L}$

**Tablica 8.** PCR program za provjeru ugradnje kanamicinske kazete unutar *leuB* i uzvodno od *ileS*, odnosno za provjeru lijeve i desne granice transpozona 10 ugrađenog unutar *ilvD*.

korak	<i>t</i> / °C	trajanje			
		<i>leuB</i>	<i>ilvD</i>	<i>ileS</i>	
početna denaturacija	95	2:00	2:00	10:00	
denaturacija	95	0:30	0:30	0:30	
sljepljivanje početnica	55	0:30	0:30	0:30	30 ciklusa
polimerizacija	72	1:30	2:00	1:45	
završna polimerizacija	72	2:00	2:00	4:00	
kraj	4	$\infty$	$\infty$	$\infty$	

### 3.2.9. Sekvenciranje

Za provjeru pojedinih promijenjenih lokusa u genomu bakterije *E. coli*, odgovarajuća regija je umnožena PCR-om (*leuB* početnicama *leuB\_F* i *leuB\_R*, *ilvD* početnicama *Tn10* i *ilvD\_R*, a dio koji kodira domenu za popravak pogreške *IleRS* početnicama *ileS\_ed\_seq\_F* i *ileS\_ed\_seq\_R*). Dobiveni produkti PCR-a su pročišćeni uz uporabu komercijalnog seta *QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)* prema uputama proizvođača i zajedno s odgovarajućim uzvodnim početnicama poslani na Sangerovo sekvenciranje u tvrtku *Macrogen*.

### 3.2.10. Agarozna gel elektroforeza

Uzorci nukleinskih kiselina analiziraju se elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen zagrijavanjem suspenzije agaroze u TAE puferu s etidijevim bromidom (*c* (Tris) = 40 mmol/L, titriran octenom kiselinom do pH = 8, *c* (EDTA) = 1 mmol/L,  $\gamma$  (etidijev bromid)

= 0,5 mg/L) tako da maseni udio agaroze bude 1 %. Otopina je nakon kraćeg hlađenja izlivena u kadicu za izlivanje gela s umetnutim plastičnim češljicima i ostavljena da se hlađenjem stvrdne. Nastali gel orijentira se u kadici za elektroforezu tako da se pozitivna elektroda nalazi na suprotnom kraju od jažica. Kadica se napuni TAE puferom s etidijevim bromidom tako da razina pufera pokrije gel.

Uzorci u koje je dodana 1/10 volumena pufera za nanošenje uzoraka ( $\gamma$  (ksilencijanolfosforat) = 2,5 g/L,  $\gamma$  (bromfenol-plavo) = 2,5 g/L,  $c$  (EDTA) = 0,07 mol/L,  $\varphi$  (glicerol) = 30 %, pH = 8) i marker molekularnih masa *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1 kb *DNA Ladder* nanese se redom u jažice i pokrene elektroforeza postavljanjem napona 120 V. Elektroforeza je gotova kad boja bromfenol-plavo dođe do kraja gela. Pruge nukleinskih kiselina na gelu vizualiziraju se uz pomoć transluminatora i snime kamerom.

#### 3.2.11. Mjerenje krivulja rasta auksotrofnih sojeva *E. coli*

Zasićena prekončna kultura sojeva ILV<sub>aux</sub> i PS7066 ILV<sub>aux</sub> u M9\* mediju uzgojena je tijekom 16 h pri 37 °C uz protresanje (250 rpm). Prekončna kultura zatim je razrijeđena do OD<sub>600</sub> = 0,04 u 5 mL M9\* medija s rasponom koncentracija norvalina od 0-3 mmol/L. Bakterije su uzgajane 8 h pri 37 °C u staklenim epruvetama uz protresanje 250 rpm. Optička gustoća mjerena je pri 600 nm na uređaju *Ultrospec 10* (*Amersham Biosciences*) uz prethodno nuliranje instrumenta medijem bez bakterija.

### 3.3. Istraživanje toksičnosti mistranslacije *in vivo*

#### 3.3.1. Mjerenje krivulja rasta bakterija

Zasićena prekončna kultura bakterije *E. coli* u odgovarajućem mediju (M9\* ili LB) uzgojena je tijekom 16 h pri 37 °C uz protresanje (250 rpm). Prekončna kultura zatim je razrijeđena do  $OD_{600} = 1,0$  i njome je u omjeru 1:100 inokuliran medij u kojem je praćen rast bakterija. Bakterije su uzgajane 16-72 h (ovisno o eksperimentu) u termostatiranom čitaču mikrotitarskih jažica (*SpectraMax iD3*) u mikrotitarskim pločicama s 24 jažice, u ukupnom volumenu od 1 mL pri 37 °C uz protresanje srednje jačine. Optička gustoća mjerena je pri 600 nm u 3-4 tehničke/biološke replike svakih 10ak min, ovisno o eksperimentu. U svakom eksperimentu uz bakterijske kulture stavljena je i slijepa proba (odgovarajući medij bez bakterija). Nakon uzgoja, izmjereni  $OD_{600}$  bakterijske kulture korigiran je slijepom probom. Po potrebi podaci su dalje obrađeni kako je opisano u poglavlju u Rezultatima (npr. pri određivanju  $IC_{50}$  vrijednosti).

#### 3.3.2. Određivanje razine mistranslacije u M9\* mediju s različitim koncentracijama nepripadnih aminokiselina

Zasićena prekončna kultura triju bioloških replika soja ED<sup>-</sup> u M9\* mediju uzgojena je tijekom 16 h pri 37 °C uz protresanje (250 rpm). Prekončnim kulturama u inokulirani su M9\* mediji s različitim koncentracijama nepripadnih aminokiselina: 0; 0,5; 1; 1,5 i 2 mM Nva/Val. Bakterije su uzgajane do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,4-0,5$ ), centrifugirane 10 min na 5000 g pri 4 °C, isprane s hladnom sterilnom otopinom NaCl ( $w = 0,85\%$ ), ponovno centrifugirane na isti način i pohranjene na -80 °C. Nakon smrzavanja, bakterije su lizirane uz pomoć komercijalne otopine za lizu stanica *BugBuster* uz dodatak lizonaze prema uputama proizvođača, odgovarajući proteom izoliran i pripremljen za mjerenje spektrometrijom masa kako je opisano u potpoglavljima 3.5.1.-3.5.4 i 3.5.7.-3.5.8. Razina mistranslacije u pojedinom proteomu određena je prema jednadžbi (1) (potpoglavlje 3.5.8.1).

#### 3.3.3. Utjecaj mistranslacije na staničnu morfologiju

Zasićena prekončna kultura bakterije *E. coli* ED<sup>-</sup> ili MG1655 uzgojena je tijekom 16 h u M9\* mediju pri 37 °C uz protresanje (250 rpm). Prekončnom kulturom u omjeru 1:100 inokulirana su tri različita medija: M9\*, M9\* + 1 mmol/L Val i M9\* + 1 mmol/L Nva. Bakterijske kulture uzgajane su na 37 °C i mikroskopirane na svjetlosnom mikroskopu (*Olympus BX51*) nakon što su dosegle  $OD_{600} = 0,5$  (eksponencijalna faza) i/ili u stacionarnoj fazi (24 h nakon inokulacije).

### 3.3.4. Test preživljavanja stanica na hranjivim pločama uz simultani mistranslacijski i toplinski stres

Zasićena prekonocna kultura bakterije *Escherichia coli* ED<sup>-</sup> (tri biološke replike) i MG1655 (tri tehničke replike) uzgojena je tijekom 16 h u M9\* mediju pri 37 °C uz protresanje (250 rpm). Bakterijska kultura potom je razrijeđena na OD<sub>600</sub> = 1,0 s M9\* medijem i iz tako razrijeđene kulture napravljena su serijska decimalna razrjeđenja u rasponu od 10<sup>-2</sup> do 10<sup>-6</sup>. Serijska decimalna razrjeđenja triplikata pojedinog soja zatim su redom nanosena u količini od 15-20 µL na M9\* ploče sa ili bez 1 mmol/L Nva/Val i inkubirane 48 h na dvije različite temperature 37 i 42 °C.

### 3.3.5. Test utjecaja mistranslacije na maksimalnu temperaturu preživljavanja

Zasićena prekonocna kultura bakterije *Escherichia coli* ED<sup>-</sup> uzgojena je u M9\* mediju tijekom 16 h pri 37 °C uz protresanje (250 rpm). Prekonocnom kulturom u inokulirani su mediji: M9\*, M9\* + 1 mM Val i M9\* + 1 mM Nva u omjeru 1:100. Bakterije su uzgajane do optičke gustoće OD<sub>600</sub> ~ 0,1, nakon čega su razrijeđene s odgovarajućim medijem na točno OD<sub>600</sub> = 0,100 i alikvotirane u 6 mikropruveta. Mikropruvete su prebačene u uređaj za PCR gdje je svaki alikvot zagrijavan 2 h na jednoj od 6 temperatura u rasponu od 48 do 51 °C. Iz dobivenih bakterijskih kultura priređena su serijska razrjeđenja u rasponu od 10<sup>-3</sup> do 10<sup>-5</sup> koja su redom nanosena u količini od 15 µL na LB ploču. LB ploče inkubirane su preko noći na 37 °C.

### 3.3.6. Test vremenskog preživljavanja bakterija pri 50 °C

Zasićena prekonocna kultura bakterije *E. coli* ED<sup>-</sup> (tri biološke replike) i MG1655 (tri tehničke replike) uzgojena je tijekom 16 h u M9\* mediju pri 37 °C uz protresanje (250 rpm). Prekonocnom kulturom u inokulirani su mediji: M9\*, M9\* + 1 mM Val i M9\* + 1 mM Nva u omjeru 1:100 i bakterije uzgajane do eksponencijalne faze rasta (OD<sub>600</sub> = 0,4-0,5). Alikvot bakterijske kulture (20 µL) pomiješan je s 980 µL 1x M9 pufera ( $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 50 \text{ mmol/L}$ ,  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 25 \text{ mmol/L}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 10 \text{ mmol/L}$ ,  $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 20 \text{ mmol/L}$ ) prethodno zagrijanog na 50 °C i dobivena suspenzija inkubirana pri 50 °C uz protresanje. Alikvoti bakterijske kulture zagrijane na 50 °C uzimani su u vremenskim točkama: 0, 2, 4, 6, 10 i 15 min i po potrebi serijski razrijeđeni otopinom 1x M9 pufera prije nanošenja na LB ploče. Na ploče je nanosena količina

suspenzije koja je rezultirala sa 100 do 300 bakterijskih kolonija (engl. *colony forming units*, CFU) po ploči.

### 3.4. Izolacija staničnih ekstrakata i interaktora DnaK

#### 3.4.1. Uzgoj bakterija i izolacija proteina u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta

Prekonoćna kultura ED<sup>-</sup> i WT soja uzgojena je u M9\* mediju pri 37 °C uz aeraciju protresanjem na 250 rpm. Prekonoćnim kulturama inokulirano je 40 mL M9\* medija, bez ili uz dodatak 1 mmol/L Nva ili Val, u omjeru 1:100. U inokuliranim kulturama bakterije su rasle na 37 °C uz aeraciju protresanjem na 200 rpm do eksponencijalne faze rasta (OD<sub>600</sub> = 0,5 – 0,6) ili do stacionarne faze rasta (24 h). Bakterijske kulture su potom centrifugirane 10 min na 5000 g pri 4 °C, a bakterijski talozi pohranjeni na -80 °C. Bakterije su lizirane s 1 mL otopine za lizu stanica *BugBuster* s dodatkom lizonaze prema uputama proizvođača: na 0,2 g smrznutih bakterija dodaje se 1 mL otopine *BugBuster* i 2 µL lizonaze s β-merkaptetanolom (*c* = 10 mmol/L) i inhibitorima proteaza (1x *cOmplete*<sup>TM</sup>, *Mini*, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, *Roche*). Bakterije su resuspendirane i nastale suspenzije inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi uz miješanje okretanjem. Stanični ostaci i netopljiva frakcija istaloženi su centrifugiranjem 15 min na 16000 g pri 4 °C. Supernatant je odvojen od taloga i pripremljen za analizu spektrometrijom masa.

#### 3.4.2. Uzgoj bakterija i izolacija DnaK interaktora u eksponencijalnoj fazi rasta

Zasićene prekonoćne kulture sojeva ED<sup>-</sup> i ED<sup>-</sup> dnaK\_His uzgojene su u M9\* mediju pri 37 °C uz protresanje na 250 rpm. Prekonoćnim kulturama inokulirano je 200 mL M9\* medija sa ili bez 1 mmol/L Val u omjeru 1:100. Inokulirane kulture uzgajane su uz protresanje od 200 rpm najprije na 37 °C (do OD<sub>600</sub> ≈ 0,2), a zatim 2 h na 42 °C (OD<sub>600</sub> ≈ 0,6). Bakterijske kulture su potom centrifugirane u trajanju od 10 min na 5000 g pri 4 °C, a bakterijski talozi pohranjeni na -80 °C. Smrznuti bakterijski talozi resuspendirani su u otopini za lizu (*c* (fosfatni pufer) = 20 mmol/L, pH = 6,5, *c* (NaCl) = 50 mmol/L, *c* (CaCl<sub>2</sub>) = 5 mmol/L, 1x *cOmplete*<sup>TM</sup>, *Mini*, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (*Roche*), *c* (β-merkaptetanol) = 10 mmol/L, *specifična aktivnost* (apiraza) = 50 U/mL, lizonaza u količini prema uputama proizvođača, *φ* (Tween 20) = 0,05 %) i bakterijske suspenzije sonicirane 4 puta u trajanju od 30 s (40 % snage, konstantni puls) s 30 s pauze na ledu. Stanični ostaci i netopljiva frakcija istaloženi su centrifugiranjem na 16 000 g na 4 °C u trajanju od 30 min. Koncentracija proteina određena je Bradfordovim testom. Alikvot staničnog ekstrakta (200-400 µg proteina) je uzet za analizu proteoma spektrometrijom

masa, a ostatak je poslužio za izolaciju interaktora šaperona DnaK. S obzirom na kiseli pH staničnog ekstrakta koji nije kompatibilan Ni-NTA smolom, pH je namješten na 8 uz uporabu otopine baze Tris ( $c = 1 \text{ mol/L}$ , titriran s HCl do  $\text{pH} = 8,0$ ). Ni-NTA smola je inkubirana u puferu za ekvibraciju ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol/L}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol/L}$ , titriran s HCl do  $\text{pH} = 8,0$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$ ), centrifugirana i potom dodana staničnom ekstraktu u omjeru  $1 \mu\text{g}$  smole prema  $1 \text{ mg}$  proteina. Ni-NTA je inkubirana sa staničnim ekstraktom u trajanju od  $1 \text{ h}$  pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , nakon čega je prenesena na mikrokolonu za kromatografiju (Pierce) i isprana s  $200$  volumena kolone s puferom za ispiranje ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol/L}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol/L}$ , titriran s HCl do  $\text{pH} = 8,0$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$ ,  $c(\text{imidazol}) = 25 \text{ mmol/L}$ ). Proteini su eluirani s puferom za eluciju ( $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol/L}$ ,  $c(\text{Tris}) = 25 \text{ mmol/L}$ , titriran s HCl do  $\text{pH} = 8,0$ ,  $\varphi(\text{glicerol}) = 10 \%$ ,  $c(\text{imidazol}) = 500 \text{ mmol/L}$ ). Uzorci dobiveni elucijom proteina iz soja ED<sup>-</sup> sadrže nespecifične interaktore (NI), a uzorci dobiveni elucijom proteina iz soja ED<sup>-</sup> dnaK\_His sadrže nespecifične i specifične interaktore DnaK (NI+SI). S  $20 \mu\text{g}$  NI odnosno NI+SI uzorka se kreće u proteolitičku razgradnju (potpoglavlje 3.5.3.) ili se analizira elektroforezom. Peptidi iz NI uzorka izotopno se označe se lakim metilnim skupinama, a iz NI+SI uzorka metiliraju se teškom oznakom (potpoglavlja 3.5.3-3.5.5), nakon toga se pomiješaju u omjeru 1:1, analiziraju LC-MS/MS (potpoglavlje 3.5.8.2).

#### 3.4.3. Analiza sastava proteina poliakrilamidnom elektroforezom s dodatkom natrijeva dodecilsulfata

Za potrebe poliakrilamidne elektroforeze s dodatkom natrijeva dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) potrebno je pripremiti dvije vrste gela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje uzoraka. Gel za razdvajanje sadrži 4 %-tni akrilamid/bisakrilamid i pufer za razdvajanje ( $c(\text{Tris}) = 0,125 \text{ mol/L}$ ,  $\gamma(\text{SDS}) = 1 \text{ g/L}$ , titriran s HCl do  $\text{pH} = 8,8$ ), a gel za sabijanje sadrži 10 %-tni akrilamid/bisakrilamid i pufer za razdvajanje ( $c(\text{Tris}) = 0,375 \text{ mol/L}$ ,  $\gamma(\text{SDS}) = 1 \text{ g/L}$ , titriran s HCl do  $\text{pH} = 6,8$ ). Gelovi se uliju između stakalca razmaknutih za  $0,75 \text{ mm}$ , tako da najprije polimerizira gel za razdvajanje, a zatim iznad njega gel za sabijanje na kojem se jažice formiraju pomoću odgovarajućeg češljica.

Uzorci tijekom elektroforeze najprije ulaze u gel za sabijanje gdje se sabijaju u tanku liniju kako bi krenuli s iste početne pozicije i kako uslijed difuzije ne bi stvarali široke pruge. Nakon što su prošli gel za sabijanje, uzorci dolaze na gel za razdvajanje koji je gušći i služi za

odvajanje proteina. Tek u njemu dolazi do odvajanja proteina uslijed efekta molekuskog sita (slika 14). Polimerizacija obaju gelova potiče se dodatkom  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  i TEMED-a.

**Tablica 9.** Sastav gela za razdvajanje i gela za sabijanje uzoraka.

Sastav	Gel za sabijanje	Gel za razdvajanje
$c$ (Tris) / (mol/L)	0,125	0,375
$\gamma$ (SDS) / (g/L)	1	1
$w$ (akrilamid/bisakrilamid 29:1) / %	4	10
$w$ $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ / %	0,07	0,09
$\varphi$ (TEMED) / %	0,06	0,05
pH	6,8	8,8

Proteinski uzorci pripreme se za elektroforezu miješanjem s puferom za nanošenje ( $c$  (Tris) = 0,25 mol/L,  $\varphi$  ( $\beta$ -merkaptoetanol) = 5 %,  $\gamma$  (bromfenol plavo) = 0,1 g/L,  $\varphi$  (glicerol) = 30 %,  $w$  (SDS) = 5 %) u volumnom omjeru 3:1 i zagrijavanjem 5 min na 95 °C. Nakon grijanja, uzorci se spuštaju na dno mikropruvete kratkim centrifugiranjem kako bi se osiguralo nanošenje ukupnog uzorka na gel. U jednu jažicu nanosi se 5  $\mu\text{L}$  markera molekulkih masa *Precision Plus Protein™ Standards Unstained*, a zatim redom ostali uzorci.

Prije nanošenja uzoraka, potrebno normirati njihovu količinu kako bi se uzorci iz različitih jažica mogli međusobno uspoređivati i kako ih se ne bi nanijelo premalo ili previše. Ukupne stanice (smjesa stanica i proteinskog ekstrakta dobivena sonikacijom), talog stanica, proteinski ekstrakt i nevezana frakcija, dobivene tijekom pročišćavanja proteina, normiraju se na isti način. U jažicu se nanosi ona količina stanica koja suspendirana u 1 ml vode ima  $\text{OD}_{600} = 0,1$ . U izračunu količine koristi se vrijednost  $\text{OD}_{600}$  izmjerena u proteinskom uzorku nakon indukcije (potpoglavlje 3.4.1).

Elektroforeza se provodi u otopini za SDS-poliakrilamidnu elektroforezu ( $\gamma$  (glicin) = 14,4 g/L,  $\gamma$  (Tris) = 3,03 g/L,  $\gamma$  (SDS) = 1 g/L) 15 min na 130 V, a zatim na 200 V dok boja bromfenol plavo ne dođe do kraja gela. Nakon što je elektroforeza gotova, gelovi se 20-ak min boje u otopini *Coomassie Brilliant Blue R-250* ( $w$  (*Coomassie Brilliant Blue R250*) = 0,25 %,  $\varphi$  ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) = 45 %,  $\varphi$  ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) = 10 %), a nespecifično vezana boja ukloni se u kipućoj vodi tijekom 20-30 min ili preko noći u otopini za odbojavanje ( $\varphi$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) = 40 %,  $\varphi$  ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) = 10 %). Alternativno, gelovi se vizualiziraju srebrom uz upute iz kompleta za bojanje srebrom *PlusOne™ Silver Staining Kit* (Amersham Biosciences).



### 3.5. Priprema uzoraka za analizu spektrometrijom masa

#### 3.5.1. Izolacija proteina taloženjem pomoću metanola i kloroforma

Vodenoj otopini proteinskog ekstrakta doda se četiri volumena metanola, jedan volumen kloroforma i tri volumena vode [130]. Nastala suspenzija se promiješa i centrifugira na maksimalnoj brzini okretaja u trajanju od 10 min. Centrifugiranjem se smjesa razdvoji u tri sloja: donju fazu čini kloroform, gornju metanol i voda, a na njihovoj granici nalazi se bijeli disk denaturiranih proteina. Gornji vodeni sloj se makne, a ostatak (donji sloj i bijeli disk) ispere s četiri volumena metanola. Bijeli talog denaturiranih proteina istaloži se centrifugiranjem na maksimalnoj brzini okretaja u trajanju od 10 min, nakon čega se supernatant ukloni, a talog osuši i otopi u denaturacijskom puferu ( $c$  (urea) = 6 mol/L,  $c$  (tiourea) = 2 mol/L,  $c$  (Tris) = 10 mmol/L, pH = 8,0).

#### 3.5.2. Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu

Priredi se 9 otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA) različitih masenih koncentracija u rasponu od: 0,2 do 1 mg/mL. Pomiješa se 1 mL Bradfordovog reagensa ( $\phi$  (etanol) = 4,8 %,  $w$  ( $H_3PO_4$ ) = 8,5 %,  $\gamma$  (Coomassie Brilliant Blue G-250) = 0,1 g/L) i 20  $\mu$ L otopine BSA odgovarajuće koncentracije te inkubira točno 5 min. Izmjeri se apsorbancija otopine na 595 nm i konstruira baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA.

Pomiješa se 1 mL i 20  $\mu$ L uzorka smjese proteina nepoznate koncentracije te inkubira točno 5 min. Na temelju izmjerene apsorbancije pri 595 nm i jednadžbe baždarnog pravca odredi se koncentracija proteina.

#### 3.5.3. Razgradnja proteina tripsinom

Smjesa proteina mase 50-100  $\mu$ g otopljena u denaturacijskom puferu ( $c$  (urea) = 6 mol/L,  $c$  (tiourea) = 2 mol/L,  $c$  (Tris) = 10 mmol/L, pH = 8,0) pomiješa se s ditiotreitolum ( $c$  = 1 mmol/L) i inkubira 1 h na 25 °C radi redukcije disulfidnih veza. Potom se doda jodoacetamid ( $c$  = 5,5 mmol/L) i inkubira 1 h na 25 °C u mraku, radi alkilacije cisteinskih bočnih ogranaka. Nakon alkilacije, indikatorskim papirićem provjeri se je li pH otopine 8. Ukoliko nije, namjesti se na 8 uz pomoć pufera Tris/HCl, pH = 8 ( $c$  = 1 mol/L). Nakon toga uzorak se 3 h inkubira na 25 °C s proteazom LysC (1  $\mu$ g LysC : 100  $\mu$ g proteina) koja cijepa peptidnu vezu u proteinima iza bočnog ogranka lizina. Zatim se uzorak razrijedi s 4 volumena amonijevog bikarbonata ( $c$  = 20 mmol/L), provjeri pH (treba biti 8) i inkubira na 25 °C s tripsinom (1  $\mu$ g tripsina : 100  $\mu$ g

proteina) preko noći. Tripsin je proteaza koja cijepa peptidnu vezu u proteinima iza aminokiselina s pozitivno nabijenim bočnim ogrankom (arginin i lizin).

#### 3.5.4. Priprema i odsoljavanje peptida na C18 materijalu

Dva sloja C18 materijala (*C18 Solid Phase Extraction Disks, Empore*) se iglicom postave unutar vrha plastičnog nastavka za pipetu od 2-200  $\mu\text{L}$  (engl. *stage tip*, slika 21) [131]. Nastavak pipete namjesti se na rupicu na čepu mikroeprevete kako bi se u mikroeprevetu skupljao eluat. Tako postavljeni stalak s nastavkom za pipetu može se centrifugirati kako bi kroz njega prolazile razne tekućine. Kroz C18 materijal se propusti 100  $\mu\text{L}$  metanola ( $\sim 1$  min na 1000 g), čime se materijal aktivira, a nakon toga 200  $\mu\text{L}$  otapala A\* ( $\varphi$  (acetonitril) = 2 %,  $\varphi$  (mravlja kiselina) = 1 %)  $\sim 3$  min na 1000 g. Važno je da C18 materijal ne presuši dok uzorak nije nanesen. Na dva sloja C18 materijala može se nanijeti do 15  $\mu\text{g}$  peptida. Nakon propuštanja otopine peptida, peptidi se vežu na C18 materijal i isperu s 200  $\mu\text{L}$  otapala A ( $\varphi$  (mravlja kiselina) = 0,1 %). Tako pripremljeni uzorci mogu se čuvati na 4 °C do mjerenja na spektrometru masa. Neposredno prije mjerenja, peptidi se eluiraju s C18 materijala s 50  $\mu\text{L}$  otapala B ( $\varphi$  (acetonitril) = 80 %,  $\varphi$  (mravlja kiselina) = 0,1 %). Uzorak se upari do  $\sim 5$   $\mu\text{L}$  volumena i nadopuni na željeni konačni volumen s otapalom A i 10 % otapala A\*.

A)



B)



**Slika 21.** Prikaz nanošenja C18 materijala (*C18 Solid Phase Extraction Disks, Empore*) na vrh plastičnog nastavka za pipetu (engl. *stage tip*). **A)** Šupljom iglom utisne se dvaput u C18 materijal koji zaostaje unutar igle i zatim **B)** se nanese na vrh plastičnog nastavka za pipetu od 2-200  $\mu\text{L}$ .

#### 3.5.5. Izotopno obilježavanje peptida na čvrstoj fazi

Postupak za izotopno obilježavanje peptida na čvrstoj fazi proveden je prema protokolu kojeg su uspostavili Boersema i suradnici [113]. Otopine za izotopno obilježavanje sastava prikazanog u tablici 10 pripremaju se svježe, neposredno prije upotrebe.

Tablica 10. Sastav otopina za izotopno obilježavanje peptida na čvrstoj fazi.

Tip oznake	Formaldehid		Natrijev cijanoborhidrid		c (fosfatni pufer, pH = 7,8) / (mmol/L)
	izotop	$\varphi$ / %	izotop	c / (mmol/L)	
laka (-CH <sub>3</sub> )	CH <sub>2</sub> O	0,2	NaBH <sub>3</sub> CN	30	45
srednja (-CHD <sub>2</sub> )	CD <sub>2</sub> O				
teška (- <sup>13</sup> CD <sub>3</sub> )	<sup>13</sup> CD <sub>2</sub> O		NaBD <sub>3</sub> CN		

Dva sloja C18 materijala se iglicom postave unutar vrha plastičnog nastavka za pipetu od 2-200  $\mu$ L (engl. *stage tip*, slika 21). Nastavak pipete namjesti se na rupicu na čepu mikroepruvete kako bi se u mikroepruvetu skupljao eluat. Tako postavljeni stalak s nastavkom za pipetu može se centrifugirati kako bi kroz njega prolazile razne tekućine. Centrifugiranje se provodi pri 1000-2000 g u trajanju potrebnom da pojedina tekućina prođe kroz C18 materijal. C18 materijal najprije se aktivira s 50  $\mu$ L metanola, zatim ekvilibrira s 200  $\mu$ L otapala A\*, a nakon toga se na njega nanese uzorak peptida. Kroz C18 materijal s vezanim peptidima se propusti 5 puta po 200  $\mu$ L jedne od triju različitih otopina za izotopno obilježavanje sastava navedenog u tablici 10. Ukupno vrijeme trajanja obilježavanja treba biti najmanje 10 min. Peptidi se tako izotopno obilježe metilnim skupinama na N-kraju i bočnom ogranku lizina. Ovisno o tipu oznake, izotopni sastav metilnih skupina bit će -CH<sub>3</sub> (laka oznaka), -CHD<sub>2</sub> (srednja oznaka) ili -<sup>13</sup>CD<sub>3</sub> (teška oznaka). Izotopno označeni peptidi isperu se s 4 puta po 250  $\mu$ L otapala A. Neposredno prije mjerenja, peptidi se eluiraju s C18 materijala s 50  $\mu$ L otapala B. Uzorak se upari do ~5  $\mu$ L volumena i nadopuni na željeni konačni volumen s otapalom A i 10 % otapala A\*. Prije miješanja peptida s različitim sastavom izotopnih oznaka, potrebno je spektrometrijom masa provjeriti efikasnost izotopnog označavanja pojedinačnih uzoraka.

### 3.5.6. Provjera efikasnosti izotopnog obilježavanja peptida na čvrstoj fazi

500 ng peptida označenih s jednom od triju različito izotopno označenih metilnih skupina (-CH<sub>3</sub>, -CHD<sub>2</sub> ili -<sup>13</sup>CD<sub>3</sub>) otopljenih u otapalu A i A\* u volumnom omjeru 9:1 analizirano je uporabom EASY-nLC™ 1200 sustava za tekućinsku kromatografiju (*Thermo Fisher Scientific*) spregnutog sa spektrometrom masa *Q Exactive HFX* (*Thermo Fisher Scientific*). Peptidi su razdvojeni kromatografijom obrnutih faza postupnim povećavanjem udjela acetonitrila (0-80 %) u mravljoj kiselini ( $\varphi = 0,1$  %) u trajanju od 60 min. Automatizirani ciklusi spektrometra masa sastojali su se od mjerenja jednog MS1 spektra nakon čega su uslijedila mjerenja MS2 spektara za do 15 najintenzivnijih iona (Top15 metoda). Dobiveni sirovi podaci procesirani su

sa softverom *MaxQuant* 1.5.2.8. uz uporabu proteomske baze podataka za bakteriju *E. coli* MG1655 K12 (taksonomski identifikator: 83333). Među postavkama unutar programa je kao laka oznaka postavljena opcija „no labeling“ (bez oznake), a kao teška oznaka je postavljena ona oznaka koja odgovara tipu izotopno označenih metilnih skupina. Nakon procesiranja, izračun efikasnosti obilježavanja je određen na temelju broja identificiranih peptida iz tablice s popisom modificiranih i nemodificiranih peptida (evidence.txt) kao udio metiliranih peptida u ukupnom broju peptida.

### 3.5.7. Postavke uređaja tijekom analize uzoraka spektrometrijom masa

LC-MS/MS analiza proteoma ED<sup>-</sup> i ILV<sub>aux</sub> te interaktora DnaK provedena je uz uporabu EASY-nLC™ 1200 sustava za tekućinsku kromatografiju (*Thermo Fisher Scientific*) spregnutu sa spektrometrom masa iz serije *Q Exactive* (*Thermo Fisher Scientific*) u Proteomskom centru Tübingen (*Thermo Fisher Scientific*). Analitička kolona (promjera 75 µm, duljine 20 cm) ručno je pakirana s punilom za kromatografiju obrnutih faza *ReproSil-Pur C18-AQ* s česticama veličine 1.9 µm (*Dr. Maisch GmbH*). Temperatura kolone je tijekom mjerenja iznosila 40 °C. Triptički peptidi razdvojeni su uporabom gradijenta otapala A i B u trajanju od 90 ili 130 min. Proteomi soja ILV<sub>aux</sub> su analizirani na spektrometru masa *Q Exactive Elite*, proteomi soja ED<sup>-</sup> na spektrometru masa *Q Exactive HF-X*, a interaktori proteina DnaK na spektrometru masa *Q Exactive HF*. MS1 spektri dobiveni su pri rezoluciji 60 000, ciljni AGC  $3 \cdot 10^6$ , u rasponu od 300 do 1750 *m/z*. Napon ESI izvora je bio 2,0 kV. Metoda kojom su bili snimani MS spektri je analiza ovisna o MS1 spektru (engl. *data dependent acquisition*, DDA) na način da je nakon snimanja MS1 spektra uslijedilo snimanje MS2 spektara za 12 najintenzivnijih iona u MS2 spektru (Top12 metoda). Rezolucija MS 2 spektara iznosila je 30 000, ciljnim AGC  $1 \cdot 10^5$ , u rasponu od 200 do 2000 *m/z*, normalizirana energija sudaranja 28, dinamičko isključenje 30 s.

Kontrolni eksperimenti proteoma MG1655 i eksperimenata u stacionarnoj fazi rasta provedeni su na EASY-nLC™ 1200 sustavu za tekućinsku kromatografiju (*Thermo Fisher Scientific*) spregnutom sa spektrometrom masa *Q Exactive Plus* (*Thermo Fisher Scientific*) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Triptički peptidi razdvojeni su uporabom gradijenta otapala A i B u trajanju od 240 min uz uporabu kolone za kromatografija obrnutih faza dimenzija 75 µm x 250 mm (*Thermo Fisher Scientific*). Metoda kojom su bili snimani MS spektri je analiza ovisna o MS1 spektru (engl. *data dependent acquisition*, DDA) na način da je nakon snimanja MS1 spektra uslijedilo snimanje MS2 spektara za 12 najintenzivnijih iona u

MS2 spektru (Top12 metoda) uz dinamičko isključenje od 20 s. MS1 spektri ( $m/z$  od 350 do 1800) su dobiveni pri rezoluciji od 70 000, a MS2 spektri pri rezoluciji 17 500.

### 3.5.8. Procesiranje i obrada podataka dobivenih LC-MS/MS analizom

#### 3.5.8.1. Procesiranje i analiza proteomskih podataka

Mjerenje na spektrometru masa rezultira datotekom koja sadrži sirove podatke mjerenja. Sirovi podaci procesirani su u programu *MaxQuant* 1.6.6.0 [111] s integriranim algoritmom za pretraživanje (engl. *search engine*) *Andromeda* [132] uz uporabu proteomske baze podataka za bakteriju *E. coli* (83333) koja je preuzeta s *UniProt* baze podataka i interne baze podataka najčešćih kontaminanti. Karbamidometilacija cisteina definirana je kao statička, a oksidacija metionina i N-terminalna acetilacija kao varijabilne modifikacije. Dodatno, zamjena izoleucina valinom ili norvalinom definirana je kao gubitak metilenske skupine (-14,0156500642 Da) na izoleucinskim pozicijama. Opcija cijepanja tripsinom čak i ukoliko prolin prethodi lizinu ili argininu („*trypsin/P*“) specificirana je kao način proteolitičke razgradnje i kao maksimalni broj promašenih mjesta cijepanja specificiran je 2. U kartici *Group specific parameters* (parametri specifični za pojedinu skupinu sirovih podataka) omogućena je kvantifikacija bez izotopne oznake (engl. *label-free quantification*, LFQ) sa zadanim postavkama kao i iBAQ (engl. *intensity based absolute quantification*). Kako bi se povećao broj identifikacija omogućena je opcija „*Match between runs*“. Procesiranje je rezultiralo mapom s različitim tablicama rezultata koje su analizirane s programima *Perseus* 1.6.14.0 [133] i *R* 4.0.3.

Razina mistranslacije određena je korištenjem tablice PSM-ova (*msms.txt*). Iz tablice su najprije uklonjene lažne identifikacije (engl. *reverse hits*) i kontaminante (engl. *contaminants*). Peptidne sekvence potom su filtrirane tako da sadrže samo pouzdano određene sekvence ( $PEP \leq 0.01$  i  $Score \geq 40$ ). Na temelju tako filtriranih podataka određena je razina mistranslacije zasebno za svako mjerenje na temelju formule:

$$\text{Razina mistranslacije} = \frac{N_{\text{Ixx}}}{N_{\text{Ixx}} + N_{\text{Ile}}}, \quad (1)$$

gdje je  $N_{\text{Ixx}}$  broj identifikacija koje unutar sekvence na poziciji izoleucina sadrže valin ili norvalin, a  $N_{\text{Ile}}$  broj identifikacija s nepromijenjenom sekvencom. Nazivnik predstavlja broj svih identifikacija gdje bi trebao biti izoleucin.

Razina ekspresije proteina određena je korištenjem tablice identificiranih proteina (*proteinGroups.txt*). Tablica je učitana u program *Perseus*, a onda su iz nje najprije uklonjene lažne identifikacije (engl. *reverse hits*), kontaminante (engl. *contaminants*) i proteini koji su

određeni samo na temelju peptida s posttranslacijskom modifikacijom (engl. *only identified by site*). Normalizirani intenziteti (engl. *LFQ intensities*) proteina zatim su logaritmirani po bazi 2. Uzeti su u obzir samo proteini koji su identificirani u 3 od 4 tehničke replike (za soj ED<sup>-</sup>), odnosno u 2 od 3 tehničke replike (za soj MG1655). Kako bi se omogućila daljnja analiza bilo je potrebno napraviti imputaciju vrijednosti intenziteta koje nedostaju (engl. *missing values*), koje su zamijenjene nasumičnim vrijednostima iz normalne distribucije (metoda *MinProb* [134]) koja simulira distribuciju normaliziranih intenziteta za proteine niskog intenziteta. Navedena distribucija napravljena modificiranjem eksperimentalno izmjerene distribucije logaritama normaliziranih intenziteta tako da je standardna devijacija smanjena na faktor 0,3 (*width* = 0,3), a srednja vrijednost distribucije pomaknuta prema nižim vrijednostima za faktor 1,8 pomnožen sa standardnom devijacijom (*downshift* = 1,8). Nakon imputacije odgovarajuće vrijednosti  $\log_2(\text{normalizirani intenzitet})$  su normalizirane medijanom. Za svaku tehničku repliku vrijednost  $\log_2(\text{normalizirani intenzitet})$  proteina iz proteoma soja uzgajanog u kontrolnim uvjetima (uzgoj u M9\* mediju) oduzeta je od vrijednosti  $\log_2(\text{normalizirani intenzitet})$  proteina iz proteoma soja uzgajanog u mistranslatirajućim uvjetima (uzgoj u M9\* + 1 mmol/L Val/Nva). Na taj način dobivene su logaritmirane vrijednosti omjera normaliziranih intenziteta u dva različita uvjeta uzgoja:  $\log_2(\text{Val/kontrola})$  odnosno  $\log_2(\text{Nva/kontrola})$ . Ukoliko je protein u jednakoj količini prisutan u oba uzorka, tada će logaritam omjera intenziteta biti jednak nuli. Signifikantnost razlike logaritma omjera intenziteta od nule određen je t-testom uz Benjamini-Hochberg korekciju za usporedbu mnogo različitih vrijednosti (FDR = 5 %). Proteini s *q*-vrijednošću ispod 0,05 i srednjom vrijednošću  $\log_2(\text{Val/kontrola})$  odnosno  $\log_2(\text{Nva/kontrola}) \geq 1$  ili  $\leq -1$  smatrani su diferencijalno eksprimiranim proteinima.

#### 3.5.8.2. Procesiranje i analiza izoliranih interaktora DnaK

Tri datoteke sa sirovim podacima koje su dobivene mjerenjem 1:1 smjese peptida iz uzorka NI+SI (s izotopnom teškom oznakom) i NI (s izotopnom lakom oznakom) u kontrolnim uvjetima (uzgoj u M9\* mediju) odnosno u mistranslatirajućim uvjetima (M9\* + 1 mM Val) procesirani su programom *MaxQuant* 1.6.6.0 [111] uz uporabu proteomske baze podataka za bakteriju *E. coli* (83333) koja je preuzeta s *UniProt* baze podataka i interne baze podataka najčešćih kontaminanti. U kartici *Group specific parameters* pod tipom oznake multiplicitet oznake namješten je na 2. Kao laka oznaka označene su opcije: DimethLys0, DimethNter0, a kao teška oznaka opcije: DimethLys8, DimethNter8. Karbamidometilacija cisteina definirana je kao statička, a oksidacija metionina, N-terminalna acetilacija i Ixx kao varijabilne

modifikacije. Opcija cijepanja tripsinom čak i ukoliko prolin prethodi lizinu ili argininu („trypsin/P“) specificirana je kao način proteolitičke razgradnje i kao maksimalni broj promašenih mjesta cijepanja specificiran je 2. U kartici globalnih parametara (*Global parameters*) unutar parametara za kvantifikaciju proteina (*Protein quantification*) minimalni broj određenih omjera je namješten je na 1 i omogućena je opcija iBAQ. Procesiranje je rezultiralo mapom s različitim tablicama rezultata koje su analizirane s programima *Perseus* 1.6.14.0 [133] i *R* 4.0.3.

Razina mistranslacije određena je iz tablice PSM-ova (msms.txt) prema jednadžbi (1). Tablica s identificiranim proteinima (proteinGroups.txt) učitana je u program *Perseus*. Za kvantifikaciju su korišteni samo normalizirani omjeri intenziteta H/L (*heavy/light*). Iz tablice su uklonjene lažno identificirani proteini (engl. *reverse hits*), kontaminante (engl. *contaminants*) i proteini koji su određeni samo na temelju peptida s posttranslacijskom modifikacijom (engl. *only identified by site*). Normalizirani omjeri intenziteta H/L logaritmirani su po bazi 2. Proteini koji su imali omjer intenziteta H/L veći ili jednak 4 u 2 od 3 replike ili su identificirani samo u uzorku NI+SI u 2 od 3 replike su nazvani interaktorima DnaK i na njima je provedena daljnja analiza.

### 3.5.9. Analiza pripadnosti skupine proteina pojedinoj funkciji u stanici

Analiza pripadnosti skupine proteina pojedinoj funkciji (engl. *gene ontology enrichment analysis*) u stanici provedena je za diferencijalno eksprimirane proteine i DnaK interaktore uz uporabu internetskog alata GeneCodis4 za organizam *E. coli*, s opcijom „*GO Biological Process*“ uz uporabu hipergeometrijskog t-testa s FDR korekcijom *p*-vrijednosti [135].

### 3.5.10. Javna dostupnost podataka

Sirovi podaci dobiveni kao rezultat LC-MS/MS mjerenja nalaze se u proteomskoj bazi podataka *ProteomeXChange* pod identifikatorom PXD041341.

### 3.6. Analiza mistranslacije u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi u bakterijama

Kako bi se utvrdilo je li razlika u mistranslaciji na izoleucinskim pozicijama u proteomu u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta specifična za bakteriju *E. coli* ili se radi o efektu koji se može generalizirati na ostale organizme, pretražena je baza podataka *ProteomeXChange*. U bazi podataka pronađeni su sirovi podaci za proteome iz 11 organizama iz eksponencijalne i stacionarne faze rasta (tablica 11).

Datoteke sa sirovim podacima navedene u tablici 11 preuzete su iz baze podataka *ProteomeXChange* i ponovno procesirane u programu *MaxQuant* 2.1.4.0 prema odgovarajućoj proteomskoj bazi podataka preuzetoj iz baze podataka *Uniprot* navedene u tablici 11. U programu je svaka sirova datoteka označena drukčijim imenom (engl. *experimental name*). Dodatno je za organizam *B. subtilis* za svaku sirovu datoteku definirano 12 frakcija, za organizam *B. pumilus* 10 frakcija, a za *B. abortus* 4 frakcije. Za organizam *B. subtilis* kao metoda izotopnog označavanja odabran je SILAC. Zamjena izoleucina valinom ili norvalinom definirana je kao gubitak metilenske skupine (-14,0156500642 Da) na izoleucinskim pozicijama (Ixx) i označena je kao varijabilna modifikacija. Opcija cijepanja tripsinom čak i ukoliko prolin prethodi lizinu ili argininu („*trypsin/P*“) specificirana je kao način proteolitičke razgradnje. Kako bi se povećao broj identifikacija omogućena je opcija „*Match between runs*“.

Nakon procesiranja, razina mistranslacije određena je korištenjem tablice PSM-ova (msms.txt). Iz tablice su najprije uklonjene lažne identifikacije (engl. *reverse hits*) i kontaminante (engl. *contaminants*). Peptidne sekvence potom su filtrirane tako da sadrže samo pouzdano određene sekvence ( $PEP \leq 0.01$  i  $Score \geq 40$ ). Na temelju tako filtriranih podataka određena je razina mistranslacije zasebno za svako mjerenje prema jednadžbi (1), a zatim i prosječna razina mistranslacije za svaku pojedinu fazu rasta.



**Tablica 11.** Popis organizama čiji su javno dostupni sirovi podaci snimljenih proteoma preuzeti iz baze podataka *ProteomeXChange* i korišteni za analizu mistranslacije na izoleucinskim pozicijama u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta. U tablici je navedena baza podataka koja je korištena za procesiranje.

Organizam	ProteomeXChange identifikator	Proteomska baza podataka	Datoteke sa sirovim podacima	Ref.
<i>Actinoplanes</i> sp SE50/110	PXD017973	UP000005440	191025-Actino-I_T3, 191025-Actino-II_T, 3191025-Actino-III_T3, 191025-Actino-I_T7, 191025-Actino-II_T7, 191025-Actino-III_T7	[136]
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	PXD005602	UP000001355	140709_V2_P2_CH_SH_C_exp1, 140709_V2_P2_CH_SH_C_exp2, 140710_V2_P2_CH_SH_C_exp3, 140715_V2_P2_CH_SH_C_stat1, 140716_V2_P2_CH_SH_C_stat2, 140717_V2_P2_CH_SH_C_stat3	[137]
<i>Bacillus subtilis</i> 168	PXD008860	UP000001570	20120716_VR_Bsu_TripleSILAC_WTPtkAtpZ_OG, 20121204_VR_Bsu_TripleSILAC_WTPtkAtpZReplicate3_OG	[138]
<i>Brucella abortus</i> 2308a	PXD020869	UP000003313	TSBL01, TSBL02, TSBL03, TSBS01, TSBS02, TSBS03	[139]
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> CBDB1	PXD018912	UP000000433	20180312_DT_CBDB1_Kac_N_E1, 20180312_DT_CBDB1_Kac_N_E2, 20180312_DT_CBDB1_Kac_N_E3, 20180312_DT_CBDB1_Kac_N_S1, 20180312_DT_CBDB1_Kac_N_S2, 20180312_DT_CBDB1_Kac_N_S3	[140]
<i>Escherichia coli</i> MG1655 K-12	PXD023729	UP000000625	Ref3094_AG_01_20200506, Ref3094_AG_02_20200506, Ref3094_AG_05_20200506, Ref3094_AG_06_20200506	-
<i>Haloferax vulcanii</i> DS2	PDX009116	UP000008243	WT_L-1C, WT_L-2C, WT_L-3C, WT_S-1C, WT_S-2C, WT_S-3C	[141]
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> S6	PXD019077	UP000018735	Mg-log-lysate-sucrose-1-(2)_OP-84+iRT_DDA, Mg-stat-lysate-sucrose-1-(2)_OP-108+iRT_2_DDA, Mg-stat-lysate-sucrose-1-(2)_OP-108+iRT_DDA, Mg-stat-lysate-sucrose-2-(1)_OP-110+iRT_DDA, Mg-stat-lysate-sucrose-3-(1)_OP-112+iRT_DDA	[142]
<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	PDX009116	UP000001879	CJ1_T1, CJ2_T1, CJ3_T1, CJ1_T3, CJ2_T3, CJ3_T3	[141]
<i>Pseudomonas putida</i> F1	PXD001219	Proteinske sekvence s <i>UniprotKB</i> taksonomskim identifikatorom 351746	FAH_F1_OD2_1, FAH_F1_OD2_2, FAH_F1_OD2_3, FAH_F1_OD2_4, FAH_F1_24h_1, FAH_F1_24h_2, FAH_F1_24h_3, FAH_F1_24h_4	[143]
<i>Staphylococcus aureus</i> NTCT 8325	PXD013151	UP000008816	SA_persistor_WT_log_rep1_18May16_Samwise_16-03-32, SA_persistor_WT_log_rep2_18May16_Samwise_16-03-32, SA_persistor_WT_log_rep3_18May16_Samwise_16-03-32, SA_persistor_WT_log_rep4_18May16_Samwise_16-03-32, SA_persistor_WT_stat_rep1_18May16_Samwise_16-03-32, SA_persistor_WT_stat_rep2_18May16_Samwise_16-03-32, SA_persistor_WT_stat_rep3_18May16_Samwise_16-03-32, SA_persistor_WT_stat_rep4_18May16_Samwise_16-03-32	[144]

## § 4. REZULTATI

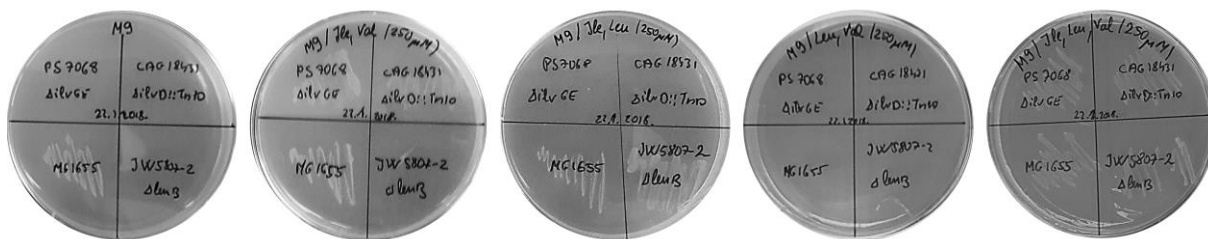
### 4.1. Dodatak norvalina smanjuje unos aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom u stanicu

#### 4.1.1. Konstrukcija auksotrofnih sojeva bakterije *Escherichia coli* za aminokiseline s razgranatim bočnim ogrankom

Putevi biosinteze aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom (engl. *branched-chain amino acids*, BCAA) – izoleucina, leucina i valina – međusobno su povezani (slika 8). U ovoj disertaciji, cilj je umjetno izazvati supstituciju izoleucina valinom ili norvalinom u proteomu bakterije *Escherichia coli*. Iz literature je poznato da je valin u visokim koncentracijama zastupljen (4 mmol/L) u bakteriji *E. coli* [9], kao i da ona u mikroaerobnim uvjetima može sintetizirati norvalin [10]. Kod umjetnog izazivanja mistranslacije u bakteriji idealno je koristiti njezin auksotrofni soj [11] za aminokiselinu čiju supstituciju promatramo (u ovom slučaju izoleucin), tako da ona u stanici bude prisutna u što manjoj količini. Istovremeno, nepripadna aminokiselina koju želimo ugraditi u proteom stanice treba biti prisutna u što većoj, ali definiranoj količini (metoda ugradnje selektivnim pritiskom, engl. *selective pressure incorporation*, SPI [145]). Prema tome, u opisanim eksperimentima idealno bi bilo koristiti auksotrofni soj koji ne može sintetizirati izoleucin, valin ni norvalin što bi omogućilo kontrolu razine mistranslacije u stanici i onemogućilo endogenu mistranslaciju valinom ili norvalinom. S obzirom na povezanost puteva biosinteze aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom (slika 8), takav auksotrofni soj je ujedno auksotrof za leucin [10].

Tijekom konstrukcije auksotrofa za BCAA kao logičan prvi izbor nameće se inaktivacija gena *ilvE* koji kodira aminotransferazu BCAA koja katalizira zadnji korak biosinteze BCAA (slika 8). Soj PS7068 u literaturi je naveden kao auksotrof za BCAA [25] i ima deletiran *ilvE* (tablica 3). I doista, PS7068 ne raste na hranjivim podlogama bez izoleucina, valina i leucina (slika 22). Međutim, raste na hranjivim podlogama s izoleucinom ( $c = 250 \mu\text{mol/L}$ ) i valinom ( $c = 250 \mu\text{mol/L}$ ) za razliku od auksotrofa za leucin – JW5807-2 (slika 22). Prema tome, PS7068 je auksotrof za izoleucin i valin, ali ne i za leucin. Pretragom literature pronađeno je da osim transaminaze BCAA (koja je deletirana u soju PS7068) zadnji korak biosinteze leucina može katalizirati i aminotransferaza aromatskih aminokiselina (TyrB,

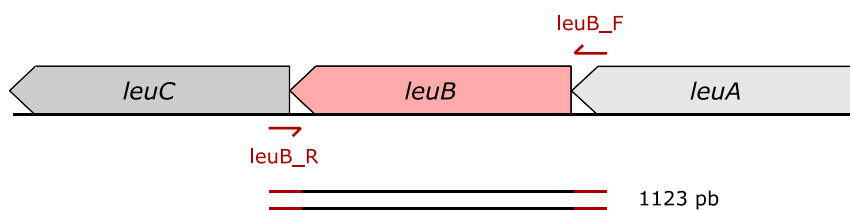
alternativna oznaka: TrD) [146]. Prema tome, zbog supstratne nespecifičnosti aminotransferaza potrebno je naći alternativni način konstrukcije auktotrofa za BCAA.



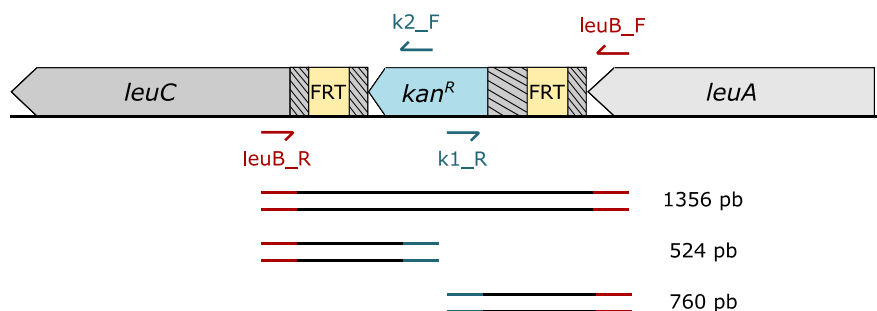
**Slika 22.** Testiranje rasta sojeva bakterije *Escherichia coli* PS7068 ( $\Delta ilvG-E$ ), CAG18431 ( $ilv-500::Tn10$ ), MG1655 i JW5807-2 ( $\Delta leuB::kan^R$ ) na hranjivoj ploči s M9 medijem sa ili bez različitih kombinacija izoleucina ( $c = 250 \mu\text{mol/L}$ ), valina ( $c = 250 \mu\text{mol/L}$ ) i leucina ( $c = 250 \mu\text{mol/L}$ ). Na ploči s M9 medijem s izoleucinom i valinom nijedan soj ne raste zbog toga što povećana količina valina izaziva pseudoauktotrofiju za izoleucin neovisno o genotipu soja [147, 148].

Inaktivacijom dvaju gena *ilvD* i *leuB* moguće je dobiti pravi auktotrof za BCAA [149]. Kako bi se konstruirao takav soj korištena su dva soja iz javno dostupnih banka sojeva: JW5807-2 ( $\Delta leuB::kan^R$ ) i CAG18431 ( $ilv-500::Tn10$ ). JW5807-2 na mjestu *leuB* gena (slika 23 A) sadrži gen za otpornost na antibiotik kanamicin okruženu FRT mjestima (slika 23 B).

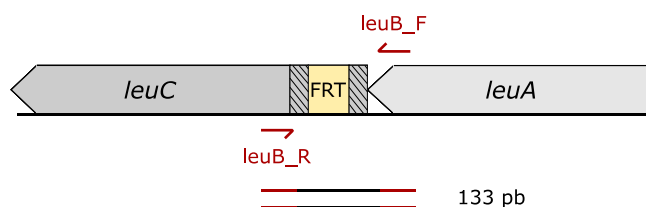
A)



B)

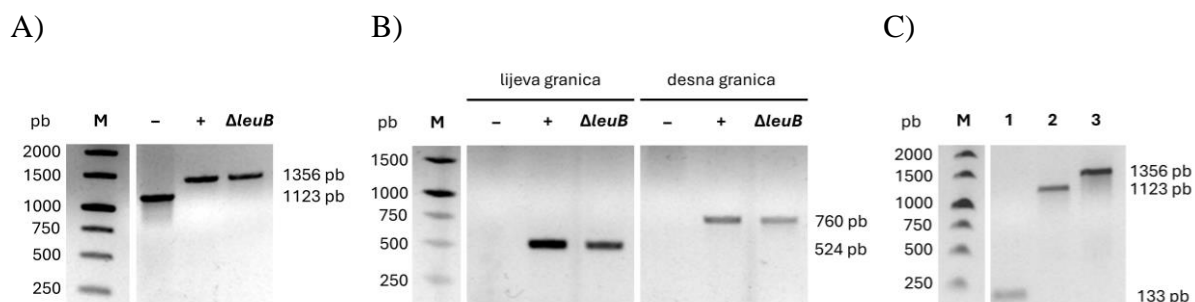


C)



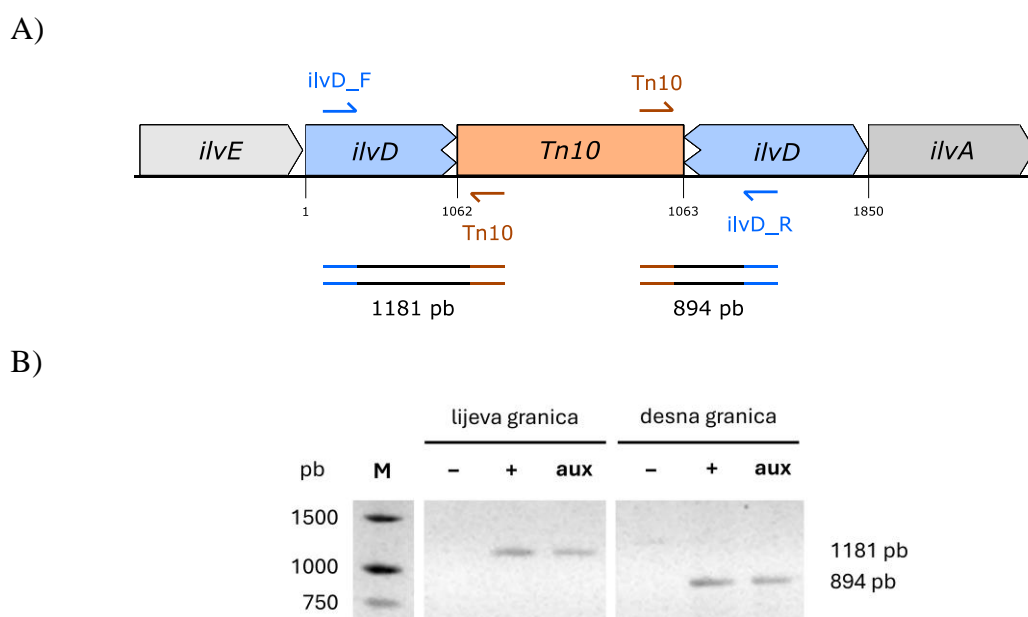
**Slika 23.** Shema položaja: **A)** intaktnog gena *leuB* u genomu bakterije *Escherichia coli* MG1655, **B)** kanamicinske kazete na mjestu deletiranog gena *leuB* u genomu bakterije *Escherichia coli* JW5807-2 i **C)** FRT ožiljka na mjestu deletiranog gena *leuB* u genomu bakterije *Escherichia coli* JW5807-2 nakon FRT-FLP mjesno-specifične rekombinacije. Naznačena su mjesta komplementarna početnicama *leuB\_F*, *leuB\_R*, *k2\_F* i *k1\_R* i shematski prikaz produkata PCR-a. Radi jasnoće, shema nije prikazana proporcionalno stvarnoj veličini.

U laboratorijski soj bakterije *E. coli* MG1655 (tablica 3) najprije je transdukcijom pomoću bakteriofaga P1 prenesen fragment gena JW5807-2, a dobiveni MG1655  $\Delta leuB::kan^R$  izoliran na pločama s kanamicinom. Lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) genomske DNA izolirane iz MG1655  $\Delta leuB::kan^R$  uz uporabu različitih kombinacija početnica (slika 23 B) potvrđen je njegov genotip (slika 24 A i B).



**Slika 24.** Analiza produkata PCR-a genomske DNA izolirane iz MG1655 (–) – negativne kontrole, JW5807-2 (+) – pozitivne kontrole, MG1655  $\Delta leuB::kan^R$  ( $\Delta leuB$ ) – konstrukta dobivenog P1 transdukcijom soja MG1655 lizatom soja JW5807-2. M – marker molekularnih masa *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1 kb *DNA Ladder*. U PCR-u su korištene početnice: **A)** leuB\_F i leuB\_R, odnosno **B)** k2\_F i leuB\_R (lijeva granica), leuB\_F i k1\_R (desna granica). **C)** Analiza produkata PCR-a genomske DNA izolirane iz konstrukta MG1655  $\Delta leuB::FRT ilv-500::Tn10$  (1) MG1655 (2) i konstrukta MG1655  $\Delta leuB::kan^R$  (3). U PCR-u su korištene početnice leuB\_F i leuB\_R.

CAG18431 sadrži sekvencu transpozona (*Tn10*) umetnutu u *ilvD* (slika 25 A).

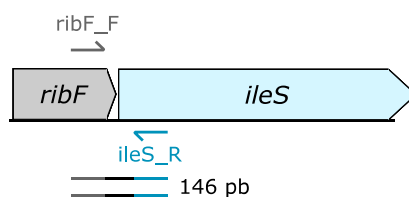


**Slika 25. A)** Shema položaja transpozona *Tn10* unutar gena *ilvD* u genomu bakterije *Escherichia coli* CAG18431. Naznačena su mjesta komplementarna početnicama *ilvD\_F*, *ilvD\_R* i *Tn10* i shematski prikaz odgovarajućih produkata PCR-a. S obzirom na inverzno repetitivne sljedove na krajevima transpozona, početnica *Tn10* se može koristiti i kao uzvodna i kao nizvodna, s time da kao uzvodna početnica nije u potpunosti komplementarna genomske DNA (jedna baza razlike). Radi jasnoće, shema nije prikazana proporcionalno stvarnoj veličini. **B)** Analiza produkata PCR-a genomske DNA izolirane iz MG1655 (–) – negativne kontrole, CAG18431 (+) – pozitivne kontrole, MG1655  $\Delta leuB::kan^R ilv-500::Tn10$  (aux). M – marker molekularnih masa *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1 kb *DNA Ladder*. U PCR-u su korištene početnice *ilvD\_F* i *Tn10* (lijeva granica), odnosno *Tn10* i *ilvD\_R* (desna granica).

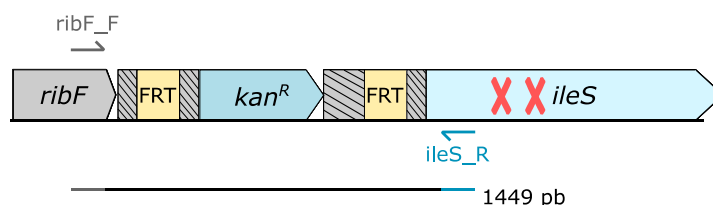
U dobiveni MG1655  $\Delta leuB::kan^R$  je potom transdukcijom bakteriofagom P1 prenesen fragment genoma CAG18431 čime je dobiven MG1655  $\Delta leuB::kan^R ilv-500::Tn10$  izoliran na hranjivim pločama s tetraciklinom. Genotip dobivenog soja potvrđen je PCR-om (slika 25 B). Iz dobivenog auksotrofnog soja MG1655  $\Delta leuB::kan^R ilv-500::Tn10$  otpornost na kanamicin izgrađena je iz genoma FRT-FLP mjesno-specifičnom rekombinacijom (slika 24 C) čime je dobiven MG1655  $\Delta leuB::FRT ilv-500::Tn10$  (dalje u tekstu ILV<sub>aux</sub>).

Nakon konstrukcije auksotrofa za BCAA, potrebno je uvesti mutacije u domenu za popravak pogreške izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS) koje deaktiviraju njezinu hidrolitičku aktivnost. Ranije je ustanovljeno da se radi o mutacijama T243R i D342A [8]. Kako bi se modificirao gen *ileS* konstruiranog auksotrofa (slika 26 A), provedena je transdukcija bakteriofagom P1 kojom prenesen fragment genoma ED<sup>-</sup> (MG1655 *ribF-kan<sup>R</sup>-ileS* T243R/D342A).

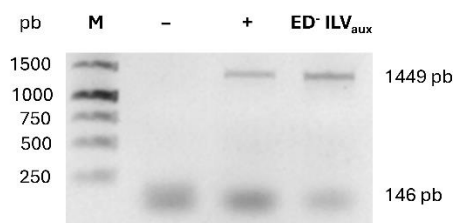
A)



B)



C)

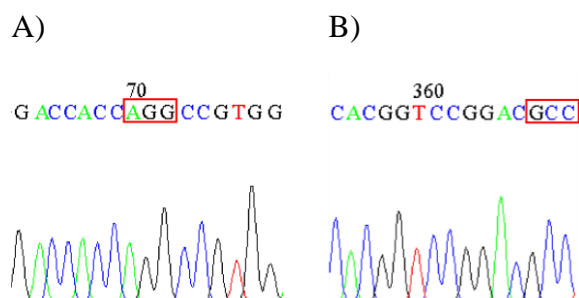


**Slika 26.** Shema položaja: **A)** intaktnih gena *ribF-ileS* u genomu bakterije *Escherichia coli* MG1655, **B)** kanamicinske kazete između *ribF* i *ileS* gena i mutacije *ileS* T243R/D342A (shematski označene crvenim X) u genomu bakterije *Escherichia coli* ED<sup>-</sup>, uz naznačena mjesta komplementarna početnicama *ribF\_F* i *ileS\_R*. **C)** Analiza produkata PCR-a genomske DNA izolirane iz MG1655 (-) – negativne kontrole, ED<sup>-</sup> (+) – pozitivne kontrole, MG1655  $\Delta leuB::FRT ilv-500::Tn10$  *ribF-kan<sup>R</sup>-ileS* T243R/D342A (ED<sup>-</sup> ILV<sub>aux</sub>) – konstrukta dobivenog P1-transdukcijom soja ILV<sub>aux</sub> lizatom soja ED<sup>-</sup>. M – marker molekularnih masa *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1 kb *DNA Ladder*. U PCR-u su korištene početnice: *ribF\_F* i *ileS\_R*. Radi jasnoće, sheme pod A i B) nisu prikazane proporcionalno stvarnoj veličini.

ED<sup>-</sup> uzvodno od gena *ileS* sadrži kanamicinsku kazetu, a unutar gena *ileS* dvije točkaste mutacije (slika 26 B). Dobiveni soj MG1655  $\Delta leuB::FRT\ ilv-500::Tn10\ ribF-kan^R-ileS$  T243R/D342A (skraćeno: ED<sup>-</sup> ILV<sub>aux</sub>) izoliran je na pločama s kanamicinom, a genotip mu je potvrđen PCR-om (slika 26 C).

S obzirom da su geni *leuB* i *ileS* u genomu bakterije *E. coli* razmaknuti 55,7 kpb, a P1-transdukcijom moguće je prenijeti do 100 kpb genetičkog materijala [27], moguće je da se prilikom transdukcije konstrukta *ribF-kan<sup>R</sup>-ileS* T243R/D342A ponovno uvede nativni gen *leuB*. Stoga je posebnu pažnju potrebno usmjeriti dodatnoj provjeri tog lokusa.

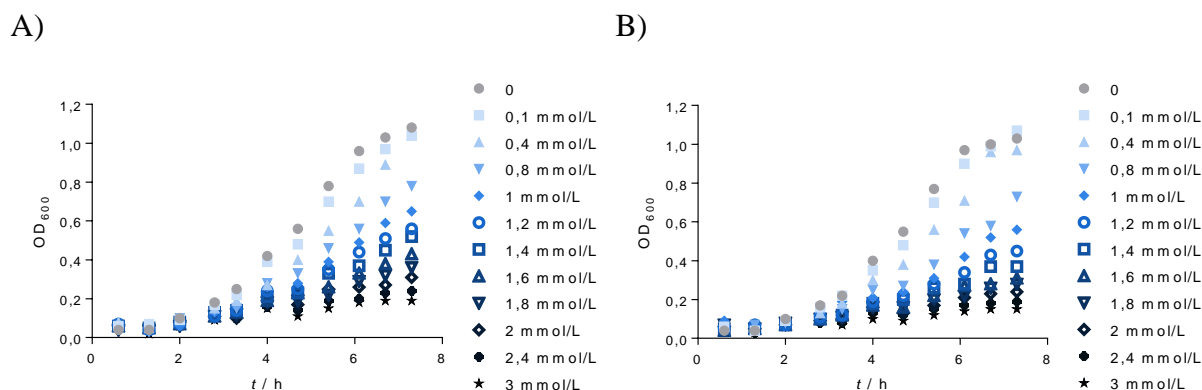
Promijenjeni dijelovi lokusa u genomu sojeva ILV<sub>aux</sub> i ED<sup>-</sup> ILV<sub>aux</sub> (*leuB*, *ilvD*, *ileS*) osim rastom na antibiotskim pločama i PCR-om, potvrđeni su i sekvenciranjem. Rezultati sekvenciranja *ileS* lokusa iz soja ED<sup>-</sup> ILV<sub>aux</sub> s početnicama *ileS\_ed\_seq\_F* i *ileS\_ed\_seq\_R* (tablica 4) potvrđuju dvije mutacije u domeni za popravak pogreške IleRS (slika 27).



**Slika 27.** Rezultati sekvenciranja potvrđuju: **A)** mutaciju ACG (Thr) → AGG (Arg) i **B)** mutaciju GAC (Asp) → GCC (Ala) u *ileS* genu u genomu bakterije ED<sup>-</sup> ILV<sub>aux</sub>. Navedeni gen kodira izoleucil-tRNA-sintetazu T243R/D342A.

#### 4.1.2. Norvalin je toksičan za soj bakterije *E. coli* auksotrofan za aminokiseline s razgranatim bočnim ogrankom

Ispitan je rast konstruiranog soja ILV<sub>aux</sub> u M9\* mediju s različitim koncentracijama norvalina u rasponu 0-3 mmol/L (slika 28 A). Norvalin pokazuje iznenađujuće toksičan utjecaj na auksotrofni soj za BCAA uzrokujući vidljivu inhibiciju rasta stanica već pri nižim koncentracijama (0,4-0,8 mmol/L). Vrijeme diobe ILV<sub>aux</sub> uz 1,4 mmol/L norvalin u mediju dvostruko je duže nego u mediju bez norvalina. Za usporedbu, divlji tip bakterije *E. coli* (MG1655) raste neometano pri koncentracijama norvalina u mediju do 10 mmol/L [8], što znači da norvalin u soju ILV<sub>aux</sub> izaziva dosad neobjašnjeni toksični efekt nepovezan s mistranslacijom. Inhibicija rasta ILV<sub>aux</sub> uzrokovana norvalinom sličnih je razmjera kao inhibicija u soju s deaktiviranim popravkom pogreške poslije prijenosa u IleRS koji je uz to auksotrof za BCAA (slika 28 B).

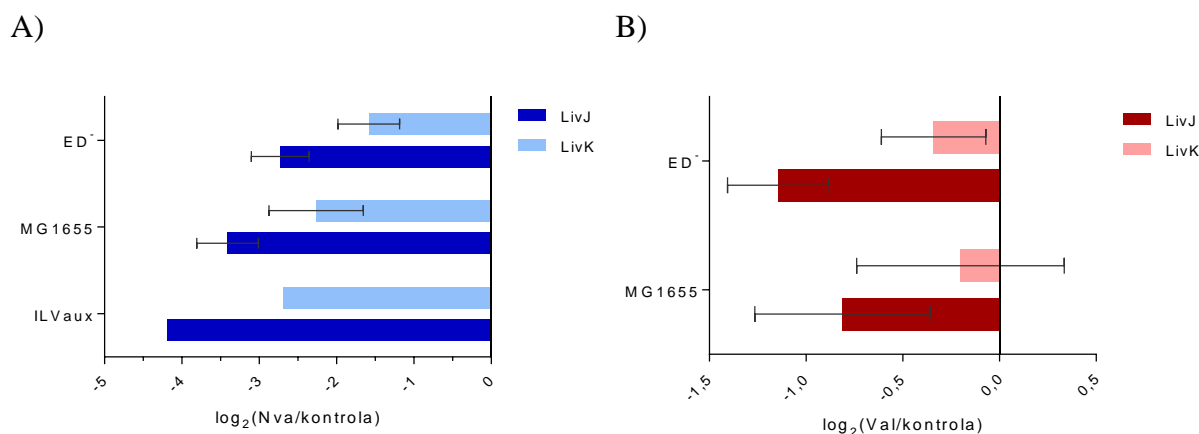


**Slika 28.** Reprezentativne krivulje rasta sojeva ILV<sub>aux</sub> (A) i PS7066 ILV<sub>aux</sub> ( $\Delta leuB::FRT ilv-500::Tn10 ileS$  241-250 Ala) (B) u M9\* mediju uz dodatak norvalina u rasponu koncentracija: 0,1 – 3 mmol/L (porast koncentracije označen je tamnijom nijansom plave). Soj PS7066 sadrži 10 alanina na pozicijama 241-250 u domeni za popravak pogreške izoleucil-tRNA-sintetaze [25]. Ovakav trend krivulja rasta potvrđen je neovisno u tri tehničke replike. Krivulje rasta određivane su mjerenjem optičke gustoće bakterija pri 600 nm u staklenim epruvetama.

Zbog svega navedenog, konstruirani auksotrofi ILV<sub>aux</sub> i ED<sup>-</sup> ILV<sub>aux</sub> nisu dobar odabir za praćenje staničnog odgovora na mistranslaciju na izoleucinskim pozicijama jer norvalin za njih pokazuje toksičan efekt neovisno o razini mistranslacije.

#### 4.1.3. Dodatak norvalina utječe na transport aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom

Kako bi se utvrdio potencijalni razlog toksičnosti norvalina za soj ILV<sub>aux</sub>, provedena je proteomska analiza soja ILV<sub>aux</sub> u M9\* mediju sa i bez 1 mmol/L norvalina. Usporedbom ekspresije proteina u navedena dva uvjeta opaženo je da dodatak norvalina u medij značajno smanjuje ekspresiju proteina LivJ (~16 puta) i LivK (~6,5 puta) koji sudjeluju u transportu BCAA [150] (slika 29 A).



**Slika 29.** Utjecaj 1 mmol/L norvalina (A) i valina (B) u M9\* mediju na ekspresiju proteina LivJ i LivK u tri različita soja bakterije *E. coli*. Stupići prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju za 4 replike (ED<sup>-</sup>) ili 3 replike (MG1655), odnosno samo jednu vrijednost (ILV<sub>aux</sub>).

Smanjenje ekspresije ovih proteina neovisno je potvrđeno i u dva druga soja MG1655 i ED<sup>-</sup> (unutar gena *ileS* sadrži dvije točkaste mutacije T243R i D342A; tablica 3) ukoliko se uzgajaju

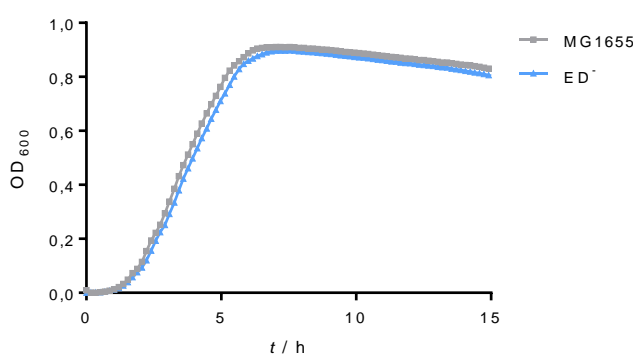
u M9\* mediju s 1 mmol/L norvalinom (slika 29 A). Paralelno, dodatak 1 mmol/L valina u M9\* medij nema efekt na ekspresiju LivK dok je ekspresija LivJ smanjena, ali u puno manjoj mjeri (slika 29 B).



## 4.2. Istraživanje toksičnosti mistranslacije *in vivo*

### 4.2.1. Karakterizacija soja bez popravka pogreške poslije prijenosa u izoleucil-*tRNA*-sintetazi u različitim uvjetima rasta

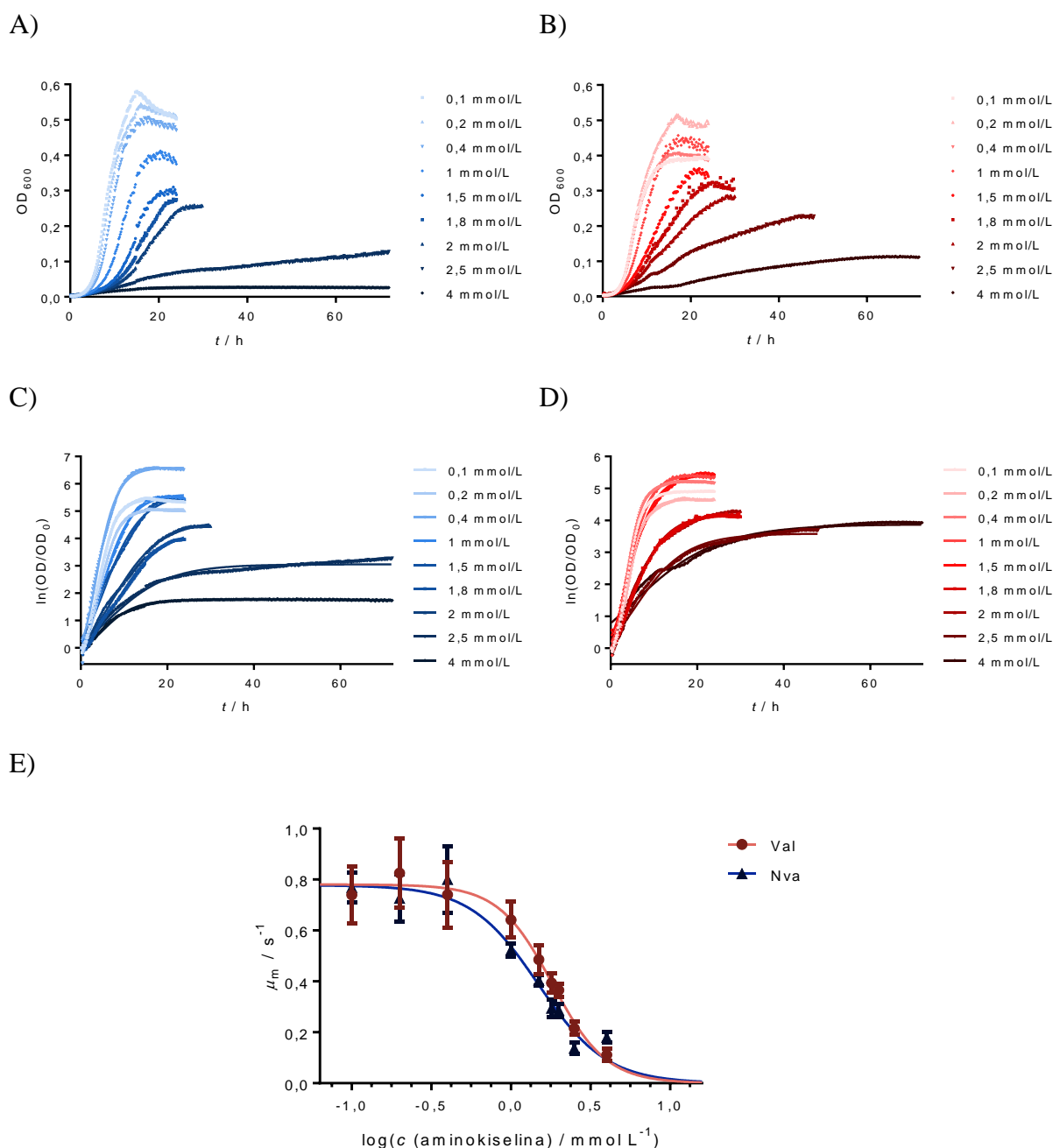
Mjerenja toksičnosti norvalina u sojevima ILV<sub>aux</sub> i PS7066 ILV<sub>aux</sub> pokazala su da je norvalin u sličnoj mjeri toksičan za oba soja (slika 28). Neočekivani utjecaj na smanjeni unos aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom u stanicu primaran je razlog toksičnosti norvalina u auksotrofnim sojevima (slika 29 A). Zbog navedenog, auksotrofni sojevi nisu korišteni u nastavku istraživanja. Umjesto njih, korišten je soj ED<sup>-</sup> koji u genomu bakterije, unutar gena *ileS* sadrži dvije točkaste mutacije T243R i D342A (tablica 3). IleRS kodirana takvim genom nema aktivnu hidrolitičku aktivnost u domeni za popravak pogreške [8]. Soj ED<sup>-</sup> u LB mediju pokazuje sličan rast kao i divlji tip bakterije *E. coli* (slika 30), ukazujući na to da je mistranslacija u bogatom mediju minimalna i da ne utječe na rast bakterije.



**Slika 30.** Krivulje rasta sojeva MG1655 i ED<sup>-</sup> (MG1655 *ileS* T243R/D342A) u LB mediju. Točke na grafu predstavljaju srednju vrijednost 6 tehničkih replika za MG1655, odnosno 2 biološke replike, od kojih je svaka mjerena u 4 tehničke replike za soj ED<sup>-</sup>.

Soj ED<sup>-</sup> zatim je uzgajan u minimalnom M9\* mediju s različitim koncentracijama valina i norvalina (u rasponu od 0 do 4 mmol/L) tijekom 72 h kako bi se odredile odgovarajuće krivulje rasta i odredila toksičnost ovih aminokiselina. Iz dobivenih krivulja rasta izrezana je faza odumiranja bakterija (slika 31 A i B) jer ona nije obuhvaćena uobičajenim modelima kinetike rasta [151]. Već pri nižim koncentracijama norvalina u M9\* mediju vidi se efekt na krivuljama rasta bakterija, s jedne strane na produženje vremena prilagodbe, a s druge na smanjenje platoa u stacionarnoj fazi (slika 31 A). Efekt postaje sve izraženiji kako se povećava koncentracija norvalina. Za razliku od norvalina, valin nema izražen efekt na vrijeme prilagodbe ni plato krivulje pri nižim koncentracijama valina (0,1-0,4 mmol/L), nego tek pri koncentraciji 1 mmol/L (slika 31 B). Pri koncentraciji  $\geq 1,5$  mmol/L dolazi do dodatnog povećanja vremena prilagodbe i utjecaja na plato u stacionarnoj fazi rasta. Pri najvišoj koncentraciji od 4 mmol/L

stanice uzgajane s valinom uspijevaju donekle narasti, dok stanice s norvalinom stagniraju (usporedi krivulje s najtamnijom nijansom na slici 31 A i B).



**Slika 31. Određivanje toksičnosti norvalina i valina za soj ED<sup>-</sup>.** Reprezentativne krivulje rasta ED<sup>-</sup> soja (MG1655 *ileS* T243R/D342A) u M9\* mediju uz dodatak norvalina (A) i valina (B) u rasponu koncentracija: 0,1 – 4 mmol/L (porast koncentracije označen je tamnijom nijansom plave za norvalin i crvenom za valin). Reprezentativne krivulje rasta potom su prikazane kao ovisnost ln(OD/OD<sub>0</sub>) o vremenu i za odgovarajuće točke provedena je nelinearna regresija Gompertzovom krivuljom za različite koncentracije norvalina (C) i valina (D). Iz Gompertzovih krivulja rasta određena je maksimalna brzina rasta za svaku pojedinu koncentraciju i prikazana njezina ovisnost o logaritmu koncentracije nepravilne aminokiseline: norvalina – Nva ili valina – Val (E). Točke su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za dvije biološke replike od kojih je svaka mjerena u 2 tehničke replike. Krivulja prikazuje nelinearnu regresiju sigmoidalnom krivuljom. Slika E preuzeta je i prilagođena iz ref. [127].

Krivulje rasta zatim su prikazane su kao ovisnost  $\ln(\text{OD}_{600}/\text{OD}_{600,0})$  o vremenu i za dobivene točke provedena je nelinearna regresija sigmoidalnom Gompertzovom krivuljom [151] (slika 31 C i D):

$$\ln \frac{\text{OD}}{\text{OD}_0} = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}, \quad (2)$$

gdje je OD optička gustoća bakterijske suspenzije pri 600 nm,  $\text{OD}_0$  prva izmjerena optička gustoća pri 600 nm,  $A$  gornji plato krivulje,  $\lambda$  vrijeme prilagodbe (engl. *lag time*), a  $\mu_m$  maksimalna brzina rasta, tj. nagib tangente u točki infleksije Gompertzove krivulje. Gompertzova krivulja odabrana je kao model za krivulje rasta jer je prema radu Zwieteringa i suradnika najbolji odabir za opis rasta bakterija sigmoidalnom krivuljom s tri parametra [151].

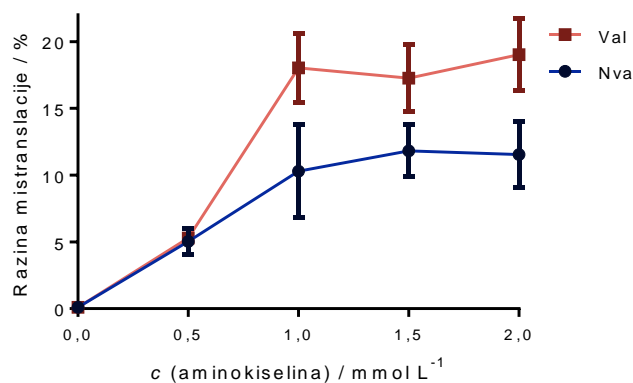
Korištenje Gompertzove krivulje za opis krivulja rasta bakterija na slikama 31 C i D podrazumijeva da je optička gustoća pri 600 nm korelirana s brojem stanica u mediju. Međutim, navedeno ne vrijedi za bakterije u stacionarnoj fazi rasta u mediju s višim koncentracijama nepripadne aminokiseline. U tim uvjetima dolazi do inhibicije stanične diobe zbog čega dolazi do stvaranja produženih filamenata (vidi potpoglavlje 4.2.2) koji drukčije reflektiraju svjetlost od individualnih bakterija pa dolazi do uvođenja određene sistematske pogreške u model. Unatoč tome, s obzirom da se filamentacija u sličnoj mjeri javlja i kod mistranslacije valinom i norvalinom, greška se u sličnoj mjeri stvara u oba uvjeta i ne bi trebala značajno utjecati na njihovu međusobnu usporedbu.

Iz Gompertzovih krivulja rasta određena je maksimalna brzina rasta za svaku pojedinu koncentraciju i prikazana njezina ovisnost o logaritmu koncentracije nepripadne aminokiseline (slika 31 E). Za navedene točke potom je provedena nelinearna regresija sigmoidalnom krivuljom s četiri parametra:

$$\mu_m = \mu_{m,\min} + \frac{\mu_{m,\max} - \mu_{m,\min}}{1 + 10^{[\log \text{IC}_{50} - \log c(\text{ak})] \cdot a}}, \quad (3)$$

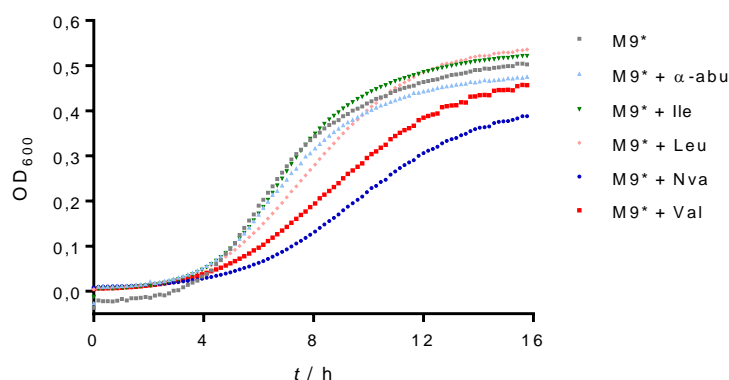
gdje su  $\mu_{m,\max}$  i  $\mu_{m,\min}$  gornji odnosno donji plato krivulje,  $\text{IC}_{50}$  je koncentracija u točki infleksije krivulje (gdje je postignuta 50 %-tna inhibicija rasta bakterija), a parametar  $a$  nagib tangente u točki infleksije krivulje koji označava koliko krivulja ima strmi odnosno blagi uspon/pad. Vrijednost  $\text{IC}_{50}$  za norvalin iznosi  $(1,42 \pm 0,08)$  mmol/L, a za valin  $(1,8 \pm 0,1)$  mmol/L, ukazujući na veću toksičnost norvalina nego valina. Trend razlike u  $\text{IC}_{50}$  vrijednostima za valin i norvalin za ED<sup>-</sup> soj sličan je kao u soju PS7066 [8]. Za usporedbu, u divljem tipu soja (MG1655)  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti za norvalin/valin iznose više od 10 mmol/L [8].

Kako bi se odredilo postoji li korelacija između ugradnje nepripadne aminokiseline na izoleucinske pozicije u proteom stanice s njezinom koncentracijom u mediju, izolirani su proteomi soja ED<sup>-</sup> u eksponencijalnoj fazi rasta u M9\* mediju s različitim koncentracijama valina i norvalina (u rasponu od 0 do 2 mmol/L). Izolirani proteini su denaturirani i pocijepani tripsinom, a odgovarajući peptidi odvojeni i analizirani tandemnom spektrometrijom masa kako bi se odredio postotak mistranslacije u različitim uvjetima rasta (slika 32).



**Slika 32.** Razina mistranslacije u proteomu soja ED<sup>-</sup> uzgajanog do eksponencijalne faze rasta u M9\* mediju s valinom (Val) ili norvalinom (Nva) u rasponu koncentracija od 0 do 2,0 mmol/L. Slika je preuzeta i prilagođena iz ref. [127].

Razina mistranslacije u proteomu stanice pri nižim koncentracijama nepripadne aminokiseline u mediju postupno se povećava, a zatim postiže zasićenje pri koncentracijama iznad 1 mmol/L. Razina mistranslacije valinom postiže više vrijednosti pri koncentracijama iznad 1 mmol/L što je primijećeno i ranije [8]. Utvrđeno je da koncentracija nepripadne aminokiseline u M9\* mediju koja iznosi 1 mmol/L izaziva sličnu razinu mistranslacije u proteomu kao i dvostruko veća koncentracija (slika 32). S obzirom da je koncentracija od 1 mmol/L niža od IC<sub>50</sub> vrijednosti za valin i norvalin pa nije previše toksična za uzgoj stanica, pogodna je za daljnja proteomska istraživanja staničnog odgovora na mistranslaciju. Kako bi se utvrdilo mogu li i neke druge aminokiseline uzrokovati inhibiciju rasta bakterija na sličan način kao i valin i norvalin, proveden je uzgoj ED<sup>-</sup> u M9\* mediju s različitim aminokiselinama u koncentraciji 1 mmol/L (slika 33). Za alternativne aminokiseline odabrane su pripadni izoleucin i dva nepripadna supstrata IleRS – proteinogeni leucin i neproteinogeni  $\alpha$ -aminobutirat [7]. Kao što je i očekivano, valin i norvalin koji su najbolji nepripadni supstrati IleRS [7] najviše inhibiraju rast ED<sup>-</sup>, dok dodatak ostalih aminokiselina ne utječe značajno na njegov rast. Dobiveni rezultati sugeriraju da je mistranslacija (slika 32) glavni uzrok inhibicije rasta ED<sup>-</sup> soja prikazanog na slikama 31 E i 33.

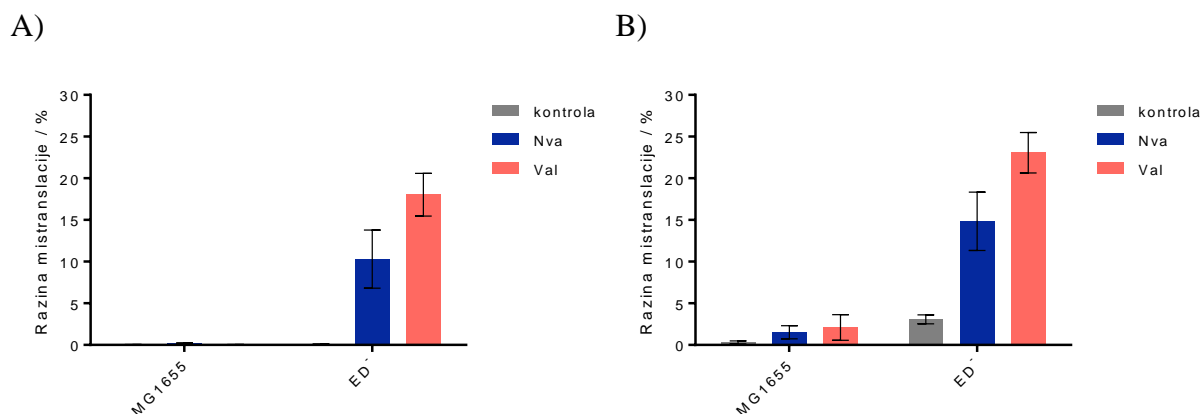


**Slika 33.** Rast soja ED<sup>-</sup> u M9\* mediju sa i bez različitih aminokiselina koncentracije 1 mmol/L. Izoleucin (Ile) je naznačen zelenom bojom, nepripadni neproteinogeni supstrati izoleucil-tRNA-sintetaze (norvalin - Nva i α-aminobutirat - α-abu) nijansama plave boje, a nepripadni proteinogeni supstrati (valin – Val i leucin - Leu) nijansama crvene boje. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [127]

Sve krivulje rasta opisane u ovom poglavlju mjerene su u čitaču mikrotitarskih pločica. Međutim, rast bakterija razlikuje se ovisno o tome jesu li uzgajane u mikrotitarskim pločicama (ukupnog volumena kulture 1 mL), staklenim epruvetama (ukupnog volumena kulture 5 mL) ili tikvicama za bakterijski uzgoj (ukupnog volumena kulture 20-200 mL). U mikrotitarskim pločicama zbog lošijeg miješanja i slabije aeracije, bakterije rastu slabije nego u epruvetama/tikvicama. Osim toga, duljina optičkog puta kraća je u mikrotitarskim jažicama nego u kivetima/epruvetama pa je i izmjerena optička gustoća manja. U mikrotitarskim pločicama bakterije postižu eksponencijalnu fazu rasta pri optičkoj gustoći između 0,1 i 0,3, ovisno o koncentraciji nepripadne aminokiseline u mediju (slika 31 A i B), dok u epruvetama i bakterijskim tikvicama dosežu eksponencijalnu fazu pri optičkoj gustoći 0,4-0,6. Optička gustoća izmjerena u epruvetama/tikvicama uzeta je kao relevantna za određivanje eksponencijalne faze u proteomskim eksperimentima.

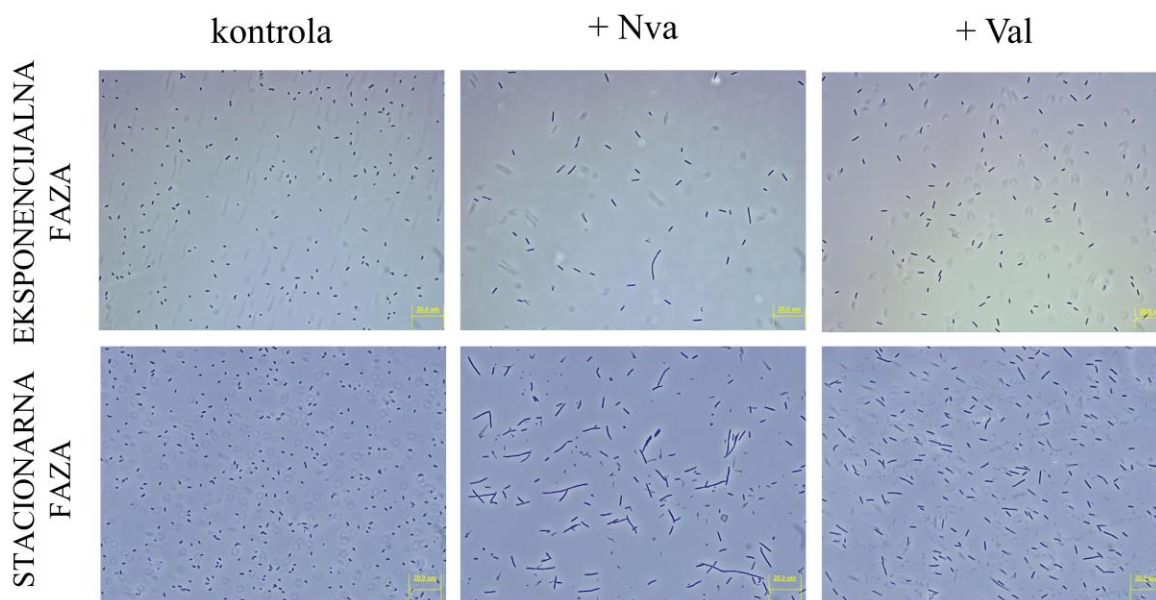
#### 4.2.2. Mistranslacija mijenja morfologiju stanica

Kako bi se odredio utjecaj mistranslacije na staničnu morfologiju, soj ED<sup>-</sup> je uzgajan u M9\* mediju sa i bez dodanog Val/Nva ( $c = 1$  mmol/L) do eksponencijalne ( $OD_{600} = 0,5$ ) i stacionarne faze rasta (nakon 24 h). U tim uvjetima određena je razina mistranslacije u proteomu (slika 34). Očekivano, razina mistranslacije povećava se kako je bakterija duže izložena mistranslatirajućim uvjetima. U eksponencijalnoj fazi iznosi  $(10 \pm 2)$  % za Nva i  $(18 \pm 2)$  % za Val, dok u stacionarnoj fazi iznosi  $(15 \pm 3)$  % za Nva i  $(23 \pm 2)$  % za Val. U kontrolnim uvjetima (bez nepripadne aminokiseline u mediju) u eksponencijalnoj fazi nema značajne mistranslacije, dok u stacionarnoj fazi ona iznosi  $(3,1 \pm 0,4)$  %.



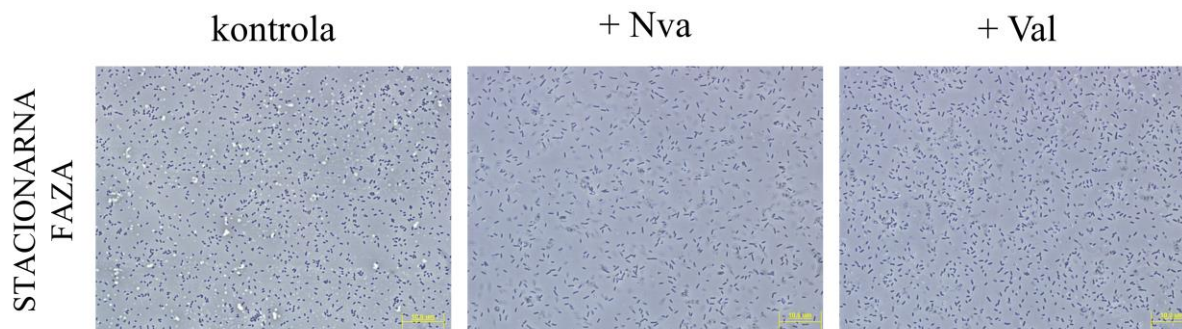
**Slika 34.** Razina mistranslacije u proteomu sojeva MG1655 i ED<sup>-</sup> nakon uzgoja u M9\* mediju – kontrola, M9\* + valin ( $c = 1$  mmol/L) – Val i M9\* + norvalin ( $c = 1$  mmol/L) – Nva do eksponencijalne ( $OD_{600} = 0,5$ ) (A) odnosno stacionarne faze rasta (24 h uzgoja) (B) pri 37 °C. Eksperimenti su izvedeni u triplicatu. Visina stupića označava srednju vrijednost, a pogreška standardnu devijaciju.

Bakterije u dvije faze rasta u sva tri medija snimljene su pod mikroskopom (slika 35). Već u eksponencijalnoj fazi rasta soj ED<sup>-</sup> pokazuje blago povećanje u uvjetima rasta s Nva ( $c = 1$  mmol/L). Stanice u stacionarnoj fazi rasta u uvjetima rasta s Nva ili Val poprimaju izraženo produljeni oblik – proces poznat kao filamentacija [152]. I dalje dolazi do replikacije DNA, ali ne i do citokineze pa nastaje filament s nekoliko kopija genomske DNA. Prema tome, mistranslacija u stacionarnoj fazi rasta inhibira staničnu diobu. U kontrolnim uvjetima, unatoč niskoj razini mistranslacije ne dolazi do filamentacije.



**Slika 35.** Soj ED<sup>-</sup> pod mikroskopom nakon uzgoja u M9\* mediju – kontrola, M9\* s valinom ( $c = 1$  mmol/L) – Val i M9\* s norvalinom ( $c = 1$  mmol/L) – Nva do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,5$ ) i stacionarne faze rasta (24 h uzgoja) pri 37 °C. Slike su reprezentativni primjer na temelju triju bioloških replika. Skala prikazuje 20 µm.

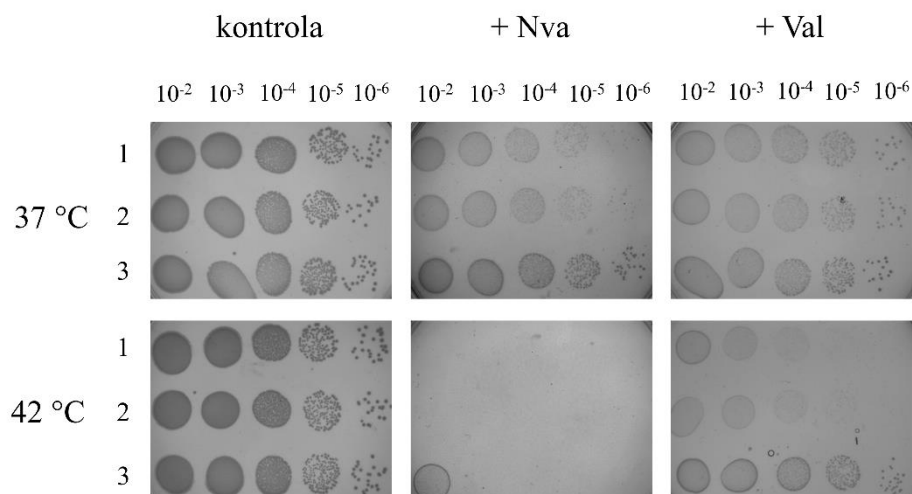
Morfologija divljeg tipa bakterije *E. coli* (MG1655) također je ispitana u stacionarnoj fazi rasta u analognim uvjetima rasta kao i ED<sup>-</sup> (slika 36). Divlji tip bakterije ne mijenja fenotip ovisno o uvjetu rasta, iz čega se može zaključiti da izloženost bakterija visokoj razini mistranslacije izaziva filamentaciju bakterija.



**Slika 36.** Soj MG16555 pod mikroskopom nakon uzgoja u M9\* mediju – kontrola, M9\* s valinom ( $c = 1 \text{ mmol/L}$ ) – Val i M9\* s norvalinom ( $c = 1 \text{ mmol/L}$ ) – Nva do stacionarne faze rasta (24 h uzgoja). Skala prikazuje 10 μm.

#### 4.2.3. Mistranslacija smanjuje preživljavanje stanica uslijed temperaturnog stresa

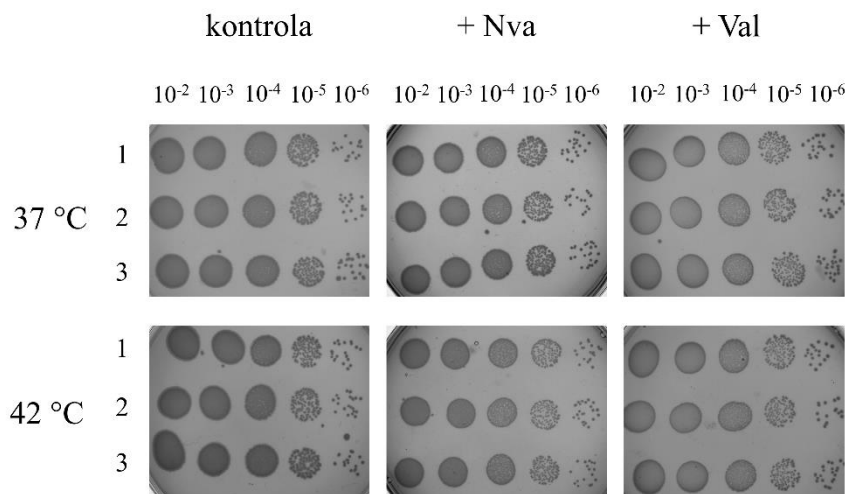
Mistranslacija može omogućiti adaptaciju bakterija na druge vrste stresova, kao što je toplinski stres [19]. Stoga je ispitano hoće li kanonska i nekanonska mistranslacija uzrokovati sličnu vrstu prilagodbe. Ispitan je rast ED<sup>-</sup> bakterija na M9\* pločama sa i bez Nva i Val ( $c = 1 \text{ mmol/L}$ ) pri 37 °C i 42 °C (slika 37).



**Slika 37.** Testiranje rasta bakterija soja ED<sup>-</sup> na M9\* pločama sa ili bez norvalina i valina koncentracije 1 mmol/L pri dvije različite temperature: 37 °C i 42 °C. Brojevima sa strane naznačene su 3 biološke replike soja ED<sup>-</sup>. Na vrhu slika označena su decimalna razrjeđenja ishodne bakterijske kulture ( $OD_{600} = 1,0$ ).

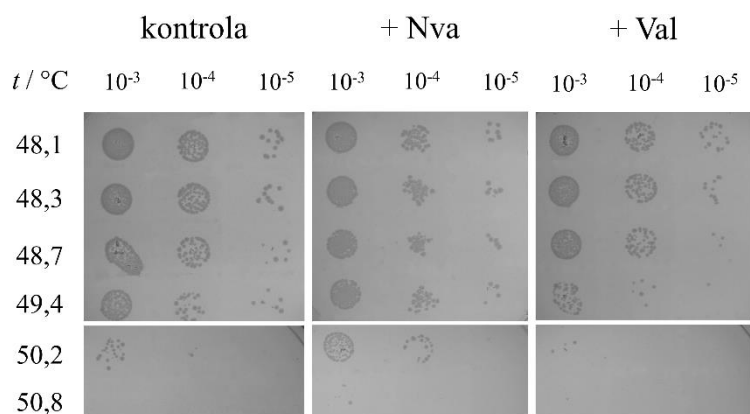
Pri 37 °C bakterijske kolonije su gušće u kontrolnim, nego u mistranslatirajućim uvjetima što je u skladu s primijećenim usporavanjem rasta bakterija u tekućoj kulturi. Dodatak temperaturnog stresa dodatno inhibira rast, uzrokujući da se pri nižim razrjeđenjima u slučaju

kanonske mistranslacije odnosno u gotovo svim razrjeđenjima u slučaju nekanonske mistranslacije ne vide bakterijske kolonije. Na istim pločama ispitan je i rast divljeg tipa bakterije *E. coli* MG1655 koji jednako raste u svim uvjetima (slika 38).



**Slika 38.** Testiranje rasta bakterija soja MG1655 na M9\* pločama sa ili bez norvalina i valina koncentracije 1 mmol/L pri dvije različite temperature: 37 °C i 42 °C. Brojevima sa strane naznačene su 3 tehničke replike soja MG1655. Na vrhu slika označena su decimalna razrjeđenja ishodne bakterijske kulture (OD<sub>600</sub> = 1,0).

S obzirom da je povišena temperatura pokazala negativan efekt na stanice s mistranslacijom, postavilo se pitanje može li mistranslacija smanjiti maksimalnu temperaturu na kojoj bakterija može preživjeti, a koja za *E. coli* iznosi oko 50 °C [153]. Bakterije soja ED<sup>-</sup> uzgajane su do rane eksponencijalne faze (OD<sub>600</sub> = 0,1) u tri različita medija (M9\*, M9\* + 1 mmol/L Nva, M9\* + 1 mmol/L Val) i potom 2 h inkubirane u uređaju za PCR pri različitim temperaturama u rasponu od 48 do 51 °C (slika 39).



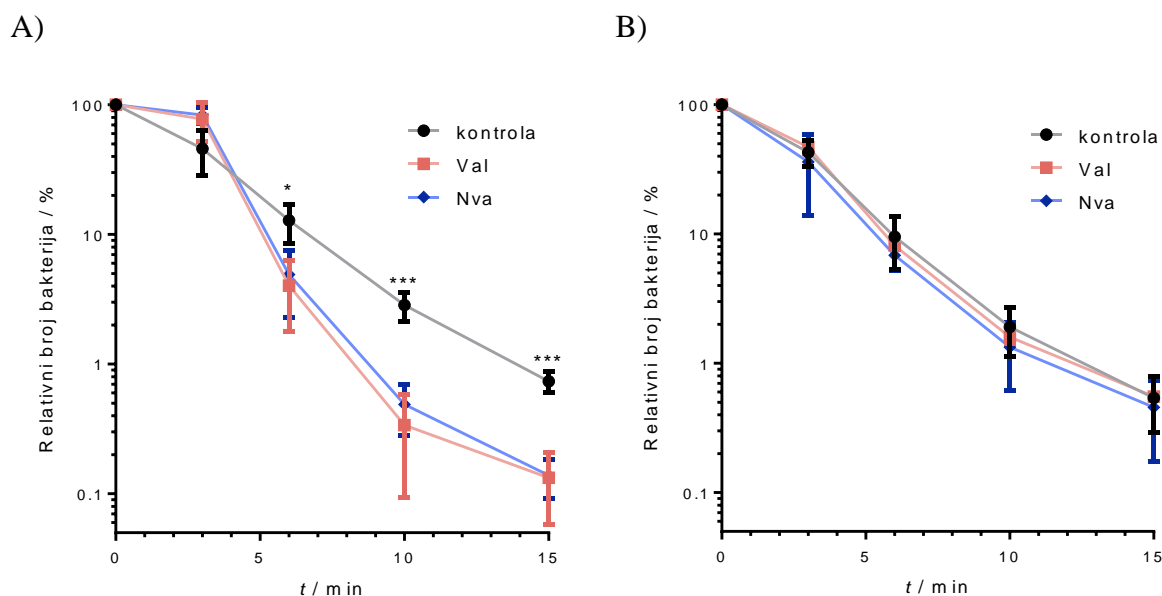
**Slika 39.** Test preživljavanja stanica soja ED<sup>-</sup>. Soj ED<sup>-</sup> uzgajan je do rane eksponencijalne faze (OD<sub>600</sub> = 0,1) u tri različita medija (M9\*, M9\* + 1 mmol/L Nva, M9\* + 1 mmol/L Val) i potom 2 h inkubirane su pri različitim temperaturama u rasponu od 48 do 51 °C. Na vrhu slika označena su decimalna razrjeđenja bakterijskih kultura.

Bakterije neovisno o uvjetu rasta umiru pri temperaturi između 50,2 i 50,8 °C što se poklapa s literaturnim podacima [153]. S obzirom da je točnost održavanja temperature u uređaju za PCR



(Bio-Rad T100™)  $\pm 0,5$  °C, sitne razlike u temperaturi umiranja između uvjeta (slika 39) se nalaze unutar pogreške instrumenta i mogu biti zanemarene. Pri višim koncentracijama Nva/Val u mediju ( $c = 2$  mmol/L) dobiven je analogan rezultat kao na slici 39 što znači da mistranslacija ne smanjuje maksimalnu temperaturu preživljavanja.

Poznato je da mistranslacija može utjecati na stabilnost proteina smanjujući njegovu temperaturnu stabilnost [13, 154]. Postavilo se pitanje hoće li viša razina mistranslacije u proteomu bakterije destabilizirati proteine do te mjere da će uzrokovati brže umiranje pri letalnoj temperaturi? U tu svrhu napravljen je eksperiment kojim je određena krivulja umiranja soja ED<sup>-</sup> pri 50 °C nakon njegovog uzgoja do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,4-0,5$ ) u tri različita medija: M9\* i M9\* + 1 mmol/L Val/Nva (slika 40 A).



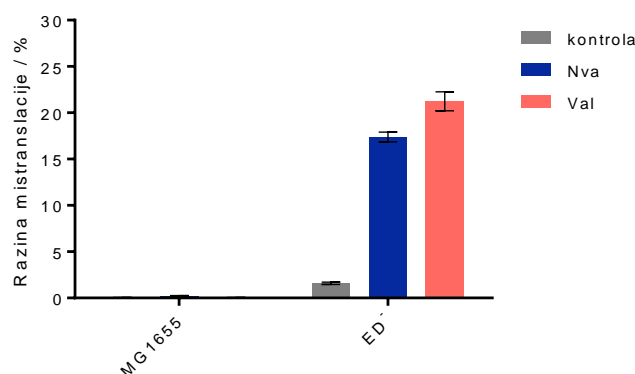
**Slika 40.** Krivulja umiranja soja ED<sup>-</sup> (A) i MG1655 (B) pri 50 °C nakon rasta u M9\* mediju bez (kontrola) ili s 1 mmol/L norvalinom (Nva) ili valinom (Val) pri 37 °C do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,4-0,5$ ). Zvezdice na grafu označavaju točke gdje se broj bakterija koje su rasle s Nva ili Val značajno razlikuje od kontrole (\* označava  $p < 0,05$ , a \*\*\* označava  $p < 0,001$ , p-vrijednost određena je obostranim t-testom). Točke na grafu iskazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za tri biološke replike (u slučaju ED<sup>-</sup>) odnosno tri tehničke replike (u slučaju MG1655). Slika je preuzeta i prilagođena iz ref. [127].

Trend umiranja soja ED<sup>-</sup> razlikuje se ovisno o uvjetu rasta. Broj živih bakterija u mistranslatirajućim uvjetima tijekom izloženosti letalnoj temperaturi između 7. i 8. minute pada ispod 1 %, a u kontrolnim uvjetima tek oko 14. minute. Divlji tip bakterije *E. coli* ne ponaša se različito ovisno o uvjetu rasta (slika 40 B) ukazujući na to da je mistranslacija glavni razlog za osjetljivost na povišenu temperaturu.

### 4.3. Proteomski odgovor na mistranslaciju

Na temelju rezultata eksperimenata *in vivo* opisanih u poglavlju 4.2. utvrđeno je da 1 mmol/L koncentracija nepripadne aminokiseline u M9\* mediju izaziva visoku razinu mistranslacije u proteomu, a niža je od odgovarajućih IC<sub>50</sub> vrijednosti ((1,42 ± 0,08) mmol/L i (1,8 ± 0,1) mmol/L za norvalin, odnosno valin). Prema tome, u uvjetima s 1 mmol/L nepripadnom aminokiselinom u mediju rast soja ED<sup>-</sup> mistranslacija i njezin utjecaj dolaze izražaja, ali ne u tolikoj mjeri da bi snažno inhibirala rast, pa je ova koncentracija odabrana za daljnje eksperimente.

Kako bi se utvrdio stanični odgovor na mistranslacijski stres, soj ED<sup>-</sup> je uzgajan u različitim medijima: M9\*, M9\* + 1 mmol/L Val i M9\* + 1 mmol/L Nva do eksponencijalne faze rasta (OD<sub>600</sub> = 0,5). Iz stanica je potom izoliran proteom i izolirani proteini pocijepani tripsinom. Rezultirajući peptidi analizirani su tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnim spektrometrom masa visoke rezolucije (LC-MS/MS). Razina mistranslacije za navedena dva soja prikazana je na slici 41.



**Slika 41.** Razina mistranslacije u proteomu sojeva MG1655 i ED<sup>-</sup> nakon uzgoja u M9\* mediju – kontrola, M9\* s valinom (c = 1 mmol/L) – Val i M9\* s norvalinom (c = 1 mmol/L) – Nva do eksponencijalne (OD<sub>600</sub> = 0,5) pri 37 °C. Eksperimenti su izvedeni u najmanje 3 tehničke replike. Visina stupića označava srednju vrijednost, a pogreška standardnu devijaciju.

Kao što je i očekivano, MG1655 pokazuje nisku razinu mistranslacije bez obzira na uvjet rasta. Nasuprot tome, soj ED<sup>-</sup> pokazuje visoku razinu mistranslacije ukoliko je uzgajan u mediju s dodatkom norvalina i valina koncentracije 1 mmol/L koja iznosi (17,4 ± 0,5) % odnosno (21,3 ± 0,9) %. Obje razine mistranslacije prikazane na slici 41 donekle se razlikuju od onih prikazanih na slici 34 A jer su izmjerene na naprednijem spektrometru masa (*Q Exactive HF*), međutim trend više razine mistranslacije Ile → Val nego Ile → Nva je zadržan. S obzirom da mistranslacija nije 100 %-tna niti reproducibilna, peptidi u kojima je Ile zamijenjen s Nva/Val uvijek su detektirani u manjoj mjeri od odgovarajućih peptida s Ile [114]. Prema tome, uporaba modernijeg spektrometra masa više rezolucije i niže granice detekcije omogućava detekciju

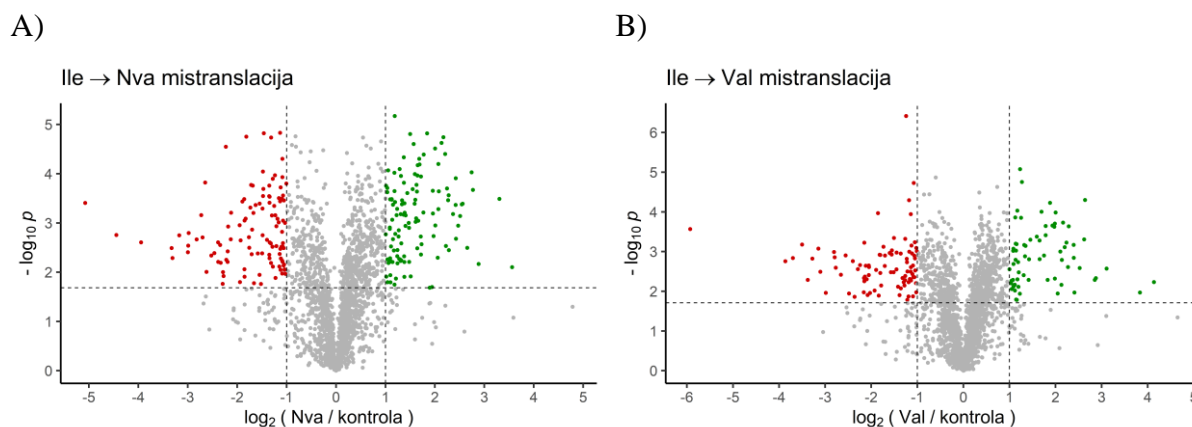
većeg broja mistranslatiranih peptida, zbog čega je u konačnici i detektirana razina mistranslacije veća.

Val i Nva imaju jednaku relativnu molekulsku masu ( $M_r = 117,151$ ), zbog čega spektrometrijom masa nije moguće razlikovati supstituciju Ile  $\rightarrow$  Val od Ile  $\rightarrow$  Nva. Osim Val/Nva dodanog u M9\* medij, primijećenoj razini mistranslacije doprinosi i bazalna razina mistranslacije uzrokovana valinom endogeno prisutnim unutar stanice ( $c = 4$  mmol/L [9]) ili kao komponentom M9\* medija ( $c = 100$   $\mu$ mol/L). Takva bazalna razina mistranslacije doprinosi ukupnoj razini mistranslacije do  $\sim 2$  %, kao što je vidljivo iz razine mistranslacije proteoma soja ED<sup>-</sup> u čistom M9\* mediju (slika 41).

Kako bi se odredila diferencijalna ekspresija proteina s obzirom na vrstu mistranslacije, određena je količina pojedinih proteina u proteomu soja ED<sup>-</sup> u M9\* mediju s Nva ili Val ( $c = 1$  mmol/L) i uspoređena s istovjetnim proteinima u proteomu soja ED<sup>-</sup> u M9\* mediju (kontrola). Proteini su kvantificirani kvantifikacijom bez izotopne oznake (engl. *label-free quantification*, LFQ) integriranom unutar programa za procesiranje podataka *MaxQuant* [155]. S obzirom da će ekspresija pojedinog proteina u različitim uvjetima uvijek biti donekle različita, potrebno je odrediti statistički kriterij kojim će se odrediti postoji li značajna razlika u njihovoj ekspresiji. Uobičajeno korišteni statistički testovi podrazumijevaju normalnu raspodjelu podataka, što nije slučaj s distribucijom LFQ-intenziteta. Međutim, logaritmirani LFQ-intenziteti prate normalnu distribuciju što omogućava njihovu statističku analizu.

Protein je definiran kao diferencijalno eksprimiran ukoliko zadovoljava dva uvjeta: i) razlika između logaritma LFQ intenziteta za dani protein u mistranslatiranom (u M9\* mediju s Nva ili Val) i kontrolnom (u M9\* mediju) uzorku je signifikantno različita od nule kako je prikazano t-testom uz primjenu postupka Benjamini-Hochberg ( $FDR = 5$  %) i ii) razina ekspresije proteina je dvostruko veća u jednom od dva uspoređivana uzorka. Diferencijalna ekspresija prikazana je grafom ovisnosti negativnog dekadskog logaritma  $p$ -vrijednosti o logaritmu po bazi dva za omjer LFQ intenziteta proteina u mistranslatiranom (Val ili Nva) uzorku i kontrolnom uzorku (slika 42). Navedeni graf (engl. *volcano plot*) poprima karakterističan V-oblik pa će u ovoj doktorskoj disertaciji biti prozvan V-grafom. Uslijed mistranslacije Ile  $\rightarrow$  Nva došlo do diferencijalne ekspresije 233 proteina (dodatna tablica 1), dok je uslijed mistranslacije Ile  $\rightarrow$  Val došlo je do diferencijalne ekspresije 158 proteina (dodatna tablica 2).

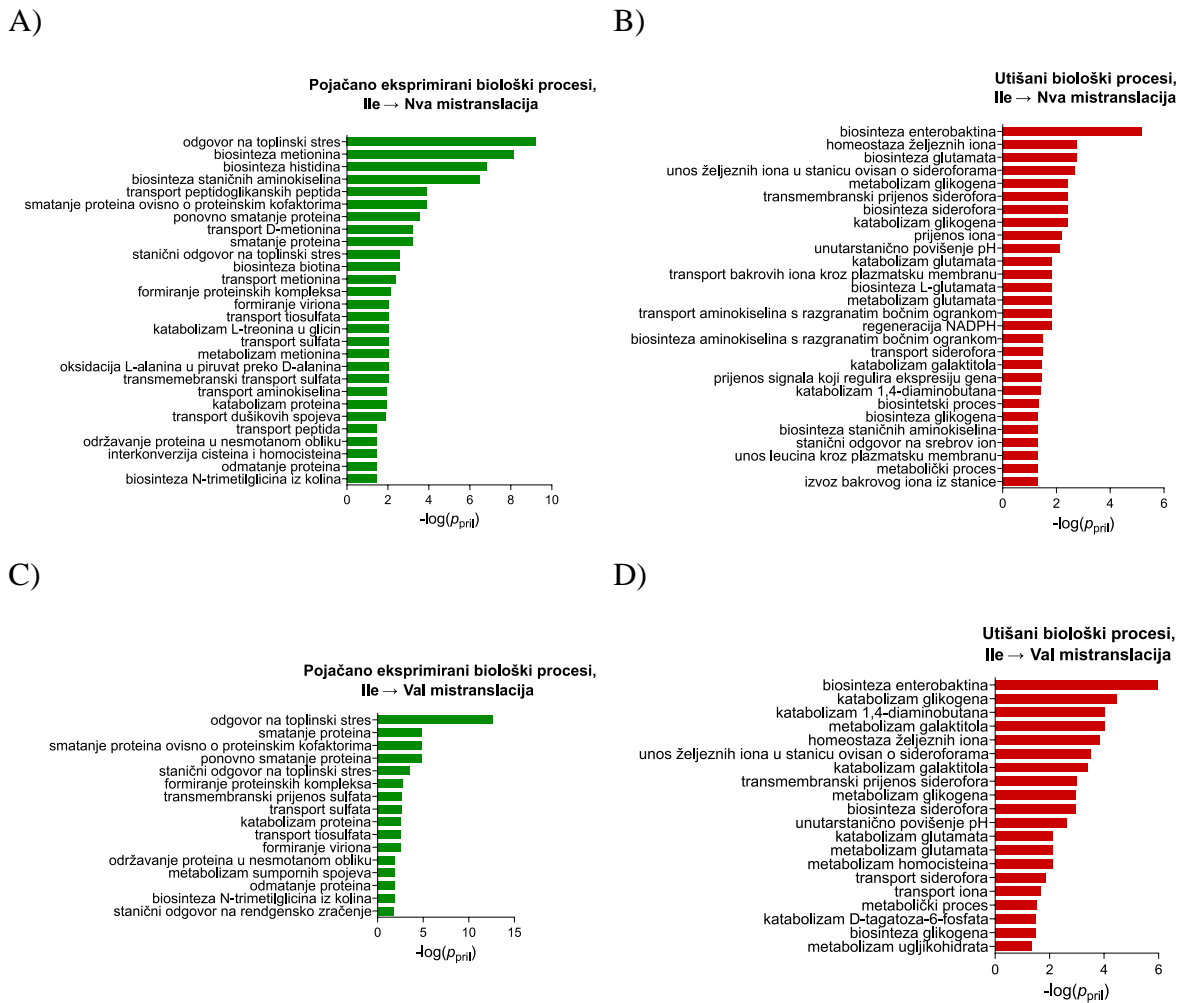
Kako bi se odredili biološki procesi kojima pripadaju diferencijalno eksprimirani proteini napravljena je analiza pripadnosti diferencijalno eksprimiranih proteina pojedinoj funkciji u stanici (engl. *gene ontology enrichment analysis*) uz uporabu internetskog alata *GeneCodis4* [135].



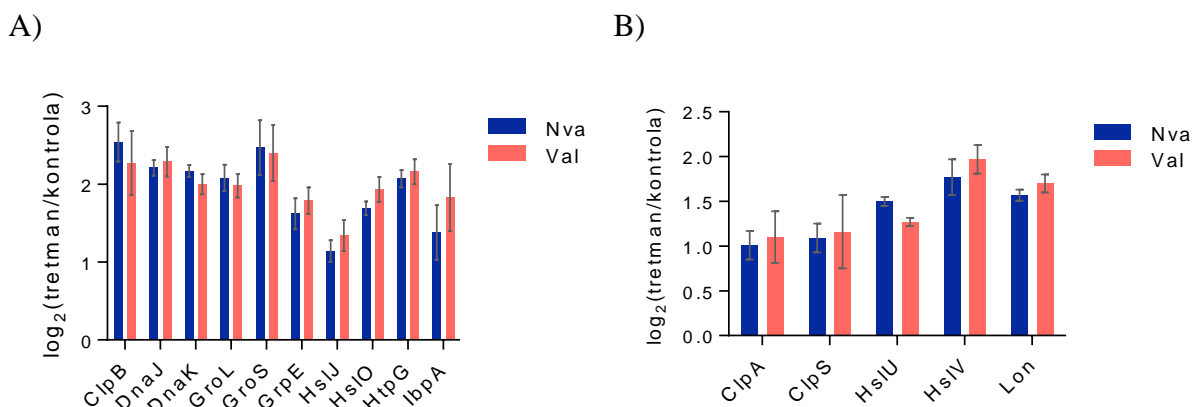
**Slika 42. A)** Ile → Nva mistranslacija uzrokuje diferencijalnu ekspresiju 233 proteina. V-graf prikazuje 114 proteina čija je ekspresija povećana (zeleno) i 119 proteina čija je ekspresija utišana (crveno). Protein je definiran kao diferencijalno eksprimiran ukoliko zadovoljava dva uvjeta: i) razlika između logaritma LFQ intenziteta za dani protein u mistranslatiranom (u M9\* mediju s Nva) i kontrolnom (u M9\* mediju) uzorku je značajno različita od nule kako je pokazano t-testom uz primjenu postupka Benjamini-Hochberg (FDR = 5 %) i ii) razina ekspresije proteina je dvostruko veća u jednom od spomenuta dva uspoređivana uzorka. **B)** Ile → Val mistranslacija uzrokuje diferencijalnu ekspresiju 158 proteina. V-graf prikazuje 68 proteina čija je ekspresija povećana (zeleno) i 90 proteina čija je ekspresija utišana (crveno). Preuzeto i prilagođeno iz ref. [127].

Analizirana je pripadnost pojačano eksprimiranih (slika 43 A i C) ili utišanih proteina (slika 43 B i D) različitim biološkim procesima u stanici. Biološki proces koji je pojačano eksprimiran uslijed oba tipa mistranslacije na izoleucinskim pozicijama je odgovor na toplinski stres (slika 43 A i C). Ovaj pojam obuhvaća šaperone i proteaze čija je sinteza inducirana, ne samo toplinskim stresom, nego i drugim vrstama stresa [18] pa treba biti shvaćen u općenitijem smislu. Među pojačano eksprimiranim šaperonima nalaze se glavni šaperonski sustavi u bakteriji *E. coli* (slika 44 A): Hsp70 (DnaK/DnaJ/GrpE), Hsp60/10 (GroES/EL) i Hsp90 (HtpG) [18]. Osim povećane ekspresije šaperona, primijećena je i pojačana ekspresija disagregaze ClpB koja zajedno sa šaperonom DnaK sudjeluje u otapanju agregata [156]. Pojačana ekspresija šaperona upućuje na to da mistranslacija utječe na terciarnu strukturu proteina i potiče odgovor na stres. Osim šaperona pojačano su eksprimirane i glavne proteaze u *E. coli*: HslV/U, Lon i dvije komponente Clp-proteaznog sustava (slika 44 B) [157]. Šaperoni i proteaze su u sličnoj mjeru eksprimirani uslijed oba tipa mistranslacije.

Mistranslacija na izoleucinskim pozicijama utišava različite metaboličke procese te utječe na transport i homeostazu željezovih iona (slika 43 B i D).



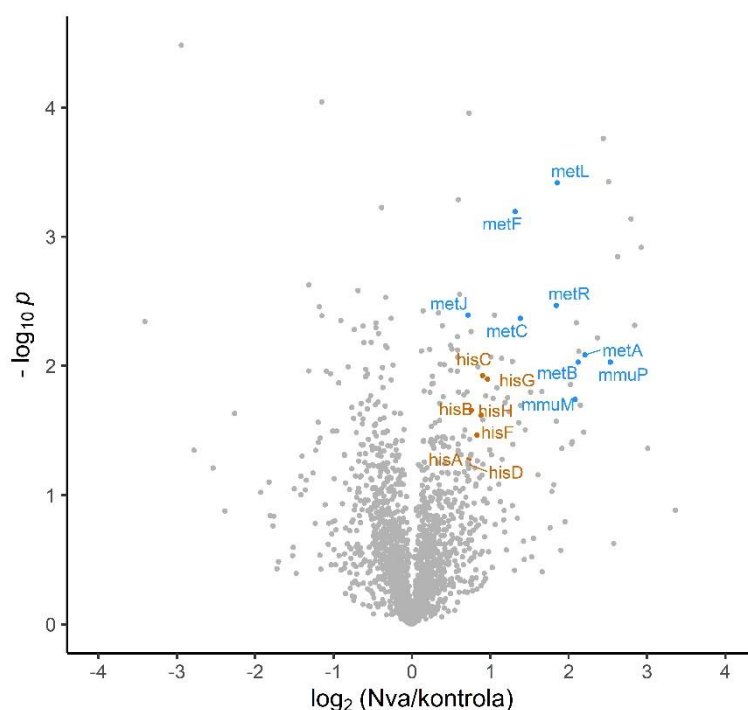
**Slika 43.** Analiza pripadnosti diferencijalno eksprimiranih proteina pojedinom biološkom procesu (engl. *gene ontology enrichment analysis, biological process*) u bakteriji *Escherichia coli* uz uporabu internetskog alata *GeneCodis4*. Prikazani su pojačano eksprimirani (A) i utišani (B) biološki procesi uslijed Ile → Nva mistranslacije, odnosno pojačano eksprimirani (C) i utišani (D) biološki procesi uslijed Ile → Val mistranslacije. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [127].



**Slika 44.** Povećana razina ekspresije šaperona (A) i proteaza (B) uslijed mistranslacije. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [127].

Uz mistranslaciju, moguće je da i dodatak visoke koncentracije nepripadne aminokiseline u medij za bakterije utječe na razlike u ekspresiji metaboličkih puteva. Zbog toga su napravljeni

kontrolni eksperimenti s MG1655 sojem koji je uzgajan u jednakim uvjetima kao i ED<sup>-</sup> nakon čega mu je proteom izoliran i razgrađen tripsinom te analiziran spektrometrijom masa (slika 45). Utvrđeno je da dodatak norvalina u medij u kojem rastu bakterije dovodi do pojačane ekspresije proteina koji su uključeni u biosintezu metionina (MetA, MetB, MetC, MetF, MetJ, MetL, MetR, MmuM i MmuP) i histidina (HisB, HisC, HisD, HisF, HisG, HisH, HisI). Prema tome, ovi biološki procesi koji su kao pojačano eksprimirani procesi uočeni uslijed Ile → Nva mistranslacije (slika 43 A) nisu posljedica same mistranslacije, nego dodatka norvalina u medij. Dodatak valina ne utječe na navedene metaboličke procese.

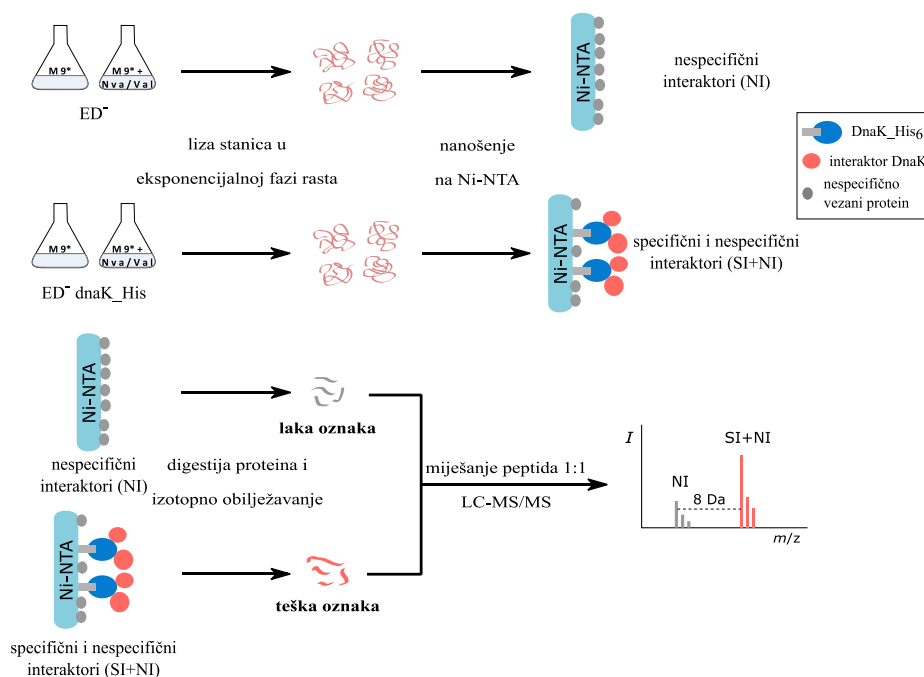


**Slika 45.** V-graf prikazuje diferencijalnu ekspresiju proteina u soju MG1655 uzgajanom u M9\* mediju s 1 mmol/L norvalinom (Nva) i bez njega (kontrola). Dodatak norvalina u medij povećava ekspresiju proteina uključenih u metabolizam metionina (plavo), i histidina (tamno narančasto).

## 4.4. Utjecaj mistranslacije na šaperonske interaktore

### 4.4.1. Izolacija interaktora proteina DnaK

Analiza proteomskog odgovora na mistranslaciju na izoleucinskim pozicijama ukazala je na pojačanu ekspresiju različitih šaperonskih sustava u bakteriji *E. coli* (slika 44 A). Među njima, DnaK je šaperon s najširim spektrom interaktora [17] čija se količina povećava 4 puta u mistranslatirajućim uvjetima (slika 44 A). Zbog širokog spektra interaktora kao i povišene ekspresije, ovaj šaperon odabran je kao modelni sustav za istraživanje utjecaja mistranslacije na vrstu i broj šaperonskih interaktora. U eksperimentima su korištena dva soja bakterije *E. coli*: ED<sup>-</sup> i soj kojemu je u genomu na 3'-kraj *dnaK* dodan kodirajući slijed za heksahistidinski afinitetni privjesak te koji sadrži mutacije T243R/D342A u *ileS* (skraćeno: ED<sup>-</sup> *dnaK*\_His) [127]. Izolacija interaktora DnaK temelji se na njihovoj izolaciji sa šaperonom tijekom afinitetne kromatografije (engl. *pull-down assay*) [17] i shematski je prikazana na slici 46. ED<sup>-</sup> *dnaK*\_His služio je za izolaciju DnaK i njegovih interaktora. Međutim, uz prave interaktore ovakvim postupkom izoliraju se i nespecifični interaktori. ED<sup>-</sup> je služio kao kontrolni soj za izolaciju nespecifičnih interaktora.



**Slika 46.** Shema izolacije interaktora DnaK. Sojevi ED<sup>-</sup> i ED<sup>-</sup> *dnaK*\_His uzgajani su u M9\* mediju sa ili bez norvalina/valina ( $c = 1$  mmol/L) do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,6$ ). Izolirani stanični ekstrakti nanoseni su na Ni-NTA kolonu. Eluirani proteini dobiveni nakon kromatografije staničnog ekstrakta soja ED<sup>-</sup> su proteini koji nespecifično interagiraju s kolonom, a proteini dobiveni nakon kromatografije staničnog ekstrakta soja ED<sup>-</sup> *dnaK*\_His su DnaK i proteini koji specifično interagiraju s njim te proteini koji nespecifično interagiraju s kolonom. Dobiveni eluati pocijepaju se tripsinom i izotopno obilježe, a zatim pomiješaju u omjeru 1:1 i analiziraju na LC-MS/MS-u. DnaK ili njegov interaktor imat će viši signal teško označenog peptida u odnosu na odgovarajući lako označeni peptid.

ED<sup>-</sup> dnaK\_His i ED<sup>-</sup> uzgajani su u mistranslatirajućim (M9\* medij s 1 mmol/L Val ili Nva) i kontrolnim uvjetima (M9\* medij) do eksponencijalne faze rasta (OD<sub>600</sub> = 0,6). Iz stanica ED<sup>-</sup> dnaK\_His je izoliran stanični ekstrakt u blagim uvjetima lize uz prisutnost apiraze – enzima koji hidrolizira ATP i na taj način osigurava da se DnaK nalazi u ispravnoj zatvorenoj konfiguraciji sa svojim interaktorom (slika 18). Izolacijom DnaK s histidinskim privjeskom na afinitetnoj koloni na kojoj je stacionarna faza nitrilotriocetna kiselina u kompleksu s Ni<sup>2+</sup> (engl. *nickel-nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA) istovremeno dolazi do izolacije njegovih interaktora (slika 46). Osim specifičnih interaktora DnaK, dolazi do izolacije nespecifičnih interaktora koji mogu imati visok afinitet prema stacionarnoj fazi, zbog čega je potrebno provesti i kontrolni eksperiment kojim će se kroz Ni-NTA kolonu propustiti proteom soja ED<sup>-</sup> izoliranog u istim uvjetima kao i proteom ED<sup>-</sup> dnaK\_His. S obzirom da soj ED<sup>-</sup> u genomu sadrži nativni *dnaK* bez afinitetnog privjeska, na Ni-NTA kolonu vezat će se samo nespecifični interaktori (slika 46). Prema tome, eluat proteoma ED<sup>-</sup> dnaK\_His sadrži specifične i nespecifične interaktore (skr. SI + NI), a eluat proteoma ED<sup>-</sup> samo nespecifične interaktore (skr. NI) (slika 46). Eluirani proteini iz oba uzorka pocijepaju se tripsinom i dobiveni peptidi kemijski označe se s dvije izotopno označene metilne skupine na slobodnim aminoskupinama (N-kraj i bočni ogranak lizina). Peptidi iz uzorka SI+NI označe se teškom (<sup>-13</sup>CD<sub>3</sub>), a peptidi iz uzorka NI lakom (-CH<sub>3</sub>) metilnom skupinom (slika 46). Efikasnost izotopnog obilježavanja potvrđuje se spektrometrijom masa kako je opisano u potpoglavlju 3.5.6. Udio izotopno označenih peptida u uzorku iznosio je najmanje 95 %. Različito izotopno označeni uzorci peptida SI+NI i NI pomiješaju se u masenom omjeru 1:1 prema koncentraciji određenoj Bradfordovim testom. Odgovarajući omjer miješanja uzoraka dodatno je namješten temeljem preliminarnih mjerenja na LC-MS/MS-u. Proteini čija količina je veća u uzorku SI+NI nego NI (slika 46) spadaju u specifične interaktore, a oni čija je količina približno jednaka u oba uzorka u nespecifične interaktore.

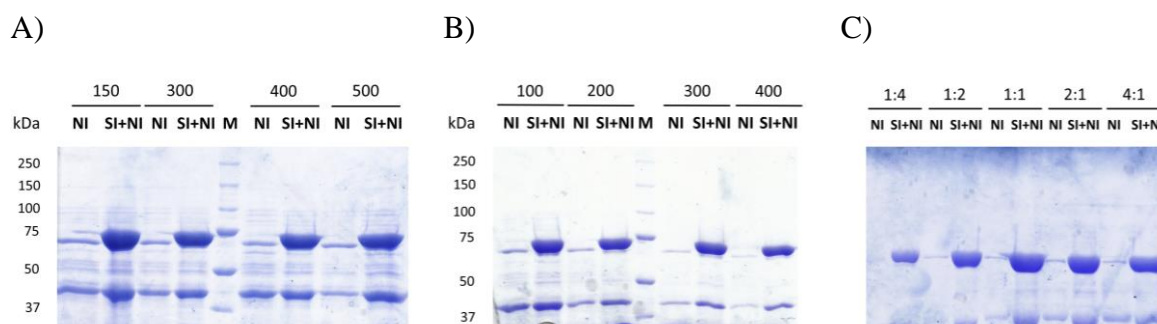
#### 4.4.2. Optimizacija postupka izolacije interaktora šaperona DnaK

Preliminarna LC-MS/MS analiza pokazala je da izolacija interaktora DnaK u uvjetima kanonske i nekanonske mistranslacije daje sličan broj interaktora: 29 ± 2 odnosno 36 ± 3. Izolacija ovako malog broja interaktora šaperona DnaK upućuje na to da je postupak njihove izolacije potrebno dodatno optimirati prije LC-MS/MS analize. Osim toga, utvrđeno je da ovakva metoda nije pogodna za praćenje razlika u ova dva tipa mistranslacije. Stoga je u



daljnjim istraživanjima analiziran broj i vrsta interaktora DnaK u kontrolnim uvjetima i uvjetima u kojima je izazvana kanonska mistranslacija.

Polazni protokol izolacije interaktora DnaK preuzet je iz istraživanja Calloni i suradnika [17], međutim s obzirom na određene izmjene u protokolu (dručkija liza stanica, afinitetna kolona, itd.) bilo je potrebno navedeni protokol validirati i prilagoditi. Kako bi se osigurala optimalna količina interaktora DnaK, važno je optimizirati postupak afinitetne kromatografije na Ni-NTA s obzirom na tip lize stanica, ionsku jakost pufera za ispiranje kolone, količinu ispiranja, omjer eluiranih proteina i količine stacionarne faze u odnosu na količinu DnaK u proteomu [158]. Dodatak glicerola pridonosi stabilizaciji protein-protein interakcija. Ovdje je u eksperimentima korišten glicerol volumnog udjela 10 %. Tijekom postupka izolacije interaktora DnaK može se mijenjati ionska jakost pufera za ispiranje kolone kao i broj ispiranja. Isprobana je izolacija interaktora DnaK u uvjetima s različitim koncentracijama NaCl u puferu za ispiranje kolone u rasponu od 150-500 mmol/L (slika 47 A).



**Slika 47.** Optimizacija postupka izolacije interaktora DnaK s obzirom na: **A)** ionsku jakost NaCl u puferu za ispiranje Ni-NTA kolone (150-500 mmol/L), **B)** količinu ispiranja kolone (100-400 volumena kolone), **C)** omjer ukupne mase proteina (u mg) i volumen Ni-NTA (u µL). NI – nespecifični interaktori (eluat staničnog ekstrakta soja ED<sup>-</sup> nakon kromatografije na Ni-NTA koloni), NI + SI – nespecifični i specifični interaktori (eluat staničnog ekstrakta soja ED<sup>-</sup> dnaK\_His nakon kromatografije na Ni-NTA koloni), M – marker molekulskih masa *Precision Plus Protein™ Standards Unstained*. Sa strane su naznačene veličine pruga u markeru molekulskih masa. Provedeni postupci optimizacije zbog ekonomičnosti nisu uključivali apirazu.

Povećanjem ionske jakosti pufera za ispiranje, količina DnaK vezanog na Ni-NTA ostaje nepromijenjena, a broj nespecifičnih interakcija se smanjuje (slika 47 A). U daljnjim eksperimentima, korištena je 500 mmol/L NaCl u puferu za ispiranje kolone. Navedena koncentracija smatra se nešto jačom verzijom ispiranja i mogla bi utjecati na proteinsku aktivnost [158], međutim s obzirom da će proteini kasnije biti analizirani spektrometrijom masa, zadržavanje proteinske aktivnosti tijekom postupka izolacije interaktora nije važno.

U idućem koraku uz uporabu NaCl koncentracije 500 mmol/L u puferu za ispiranje, ispitan je utjecaj količine ispiranja na razliku u uzorcima NI i NI+SI. Kolona je ispirana s količinama pufera za ispiranje u rasponu od 100 do 400 volumena kolone. Količina vezanog

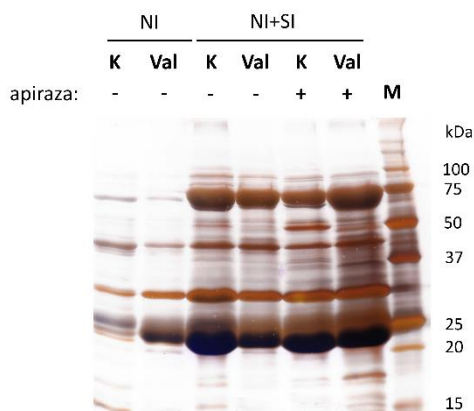
DnaK s obzirom na broj provedenih ispiranja ostaje slična, osim u uzorku koji je ispiran s 400 volumena kolone (slika 47 B). S obzirom da je količina proteina u uzorcima NI koji su ispirani s 200, 300 i 400 volumena kolone slični, 200 ispiranja kolone odabran je kao optimalni broj ispiranja.

Kako bi se smanjio broj nespecifičnih interaktora, važno je osigurati da Ni-NTA kolona bude zasićena s DnaK. Na taj način se ujedno povećava osjetljivost detekcije DnaK i njegovih interaktora. Kako bi se utvrdili uvjeti u kojima je Ni-NTA kolona zasićena s DnaK, ispitani su različiti omjeri količine proteina staničnom ekstraktu (u mg) i volumena stacionarne faze (u  $\mu\text{L}$ ) u rasponu od 1:4 do 4:1 (slika 47 C). Porastom navedenog omjera s 1:4 na 1:1 dolazi do povećanja količine DnaK vezanog na kolonu, nakon toga daljnji porast omjera ne mijenja količinu vezanog DnaK što je znak da je došlo do zasićenja kolone. Omjer 1 mg proteina u staničnom ekstraktu na 1  $\mu\text{L}$  Ni-NTA stacionarne faze odabran je u daljnjim eksperimentima.

Osim parametara afinitetne kromatografije Ni-NTA potrebno je optimirati koncentraciju apiraze u puferu za lizu stanica kako bi se osigurala dovoljna količina enzima da brzo hidrolizira ATP kako ne bi došlo do gubitka interaktora. Koncentracija ATP-a u bakteriji *E. coli* procijenjena je na 10 mmol/L [9]. Ukoliko se lizira u otprilike 10 puta većoj koncentraciji pufera za lizu njegova konačna koncentracija u puferu iznosi otprilike 1 mmol/L. Testiranje aktivnosti apiraze (napravio dr. sc. Igor Živković) pokazala su da je koncentracija apiraze 50 U/mL dovoljna za hidrolizu 98 % ATP (1 mmol/L) u manje od 1 min, što je dovoljno brza reakcija da osigura stabilnost nastanka kompleksa između DnaK i njegovih interaktora.

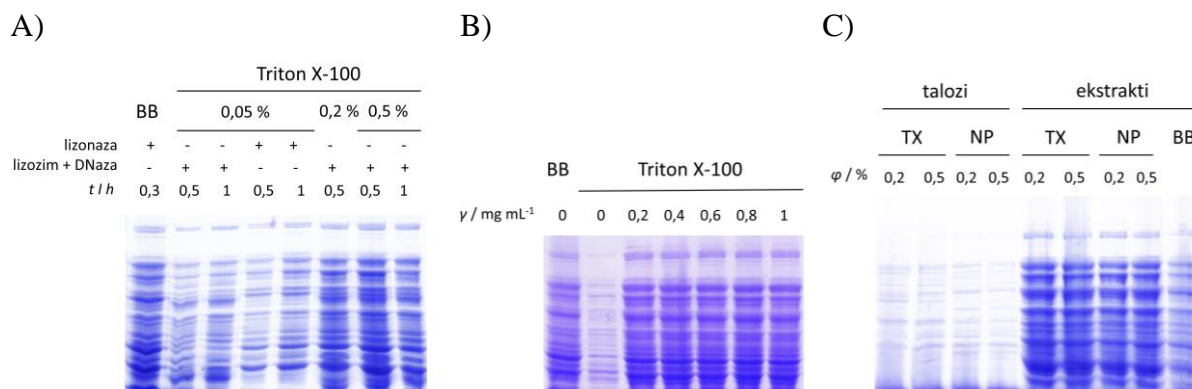
Kako bi se ispitala važnost dodatka apiraze u pufer za lizu stanica, napravljen je eksperiment u kojem je uspoređen uzorak NI+SI uz i bez dodatka apiraze (50 U/mL) u pufer za lizu (slika 48). Vidljivo je kako intenzitet pruga u NI+SI uzorku raste ukoliko je dodana apiraza, posebno u uzorku izoliranom iz stanica koje su rasle u mistranslatirajućim uvjetima (uz dodatak 1 mmol/L valina u M9\* mediju).

Važno je osigurati da liza stanica koja prethodi izolaciji interaktora bude izvedena u blagim uvjetima u kojima su sačuvane proteinske interakcije. Za lizu stanica u kojoj se žele sačuvati proteinske interakcije pogodno je koristiti neionske surfaktante kao što su Triton X-100 ili NP-40 u volumnom udjelu od 0,1 do 1 % [158]. Osim navedenih surfaktanata mogu se koristiti komercijalni kompleti za lizu stanica kao što je kombinacija otopine *BugBuster* (koja prema opisu proizvođača sadrži neionski surfaktant) i lizonaza (smjesa nukleaze benzonaze i rekombinantnog lizozima) koja prema opisu proizvođača osigurava blage uvjete lize.



**Slika 48.** Utjecaj apiraze na postupak izolacije interaktora DnaK. Sojevi ED<sup>-</sup> i ED<sup>-</sup> dnaK\_His uzgojeni su do eksponencijalne faze rasta ( $OD_{600} = 0,6$ ) u M9\* mediju s 1 mmol/L valinom (Val) i bez njega (K). Provedena je liza stanica sa ili bez apiraze (naznačeno s – odnosno +). Na SDS-PAGE gel nanieseni su uzorci nakon afinitetne kromatografije staničnog ekstrakta ED<sup>-</sup> kojim su izolirani nespecifični interaktori (NI), odnosno ED<sup>-</sup> dnaK\_His kojim su izolirani specifični i nespecifični interaktori (NI+SI). Na gel je M – marker molekulskih masa *Precision Plus Protein™ Standards Unstained*. Sa strane su naznačene veličine pruga u markeru molekulskih masa.

Najprije je istraživana efikasnost lize stanica s različitim volumnim udjelima Tritona X-100, efikasnost lize uz dodatak lizozima i Dnaze i različita duljina trajanja lize (slika 49 A). Utvrđeno je da je 2%-tni volumni udio Tritona X-100 dovoljan za efikasnu lizu stanica. Ujedno je 30 min bilo dovoljno za lizu stanica. Kombinacija lizozima i Dnaze davala je slične rezultate kao lizonaza. Nadalje je određivana optimalna koncentracija lizozima u puferu za lizu (slika 49 B).

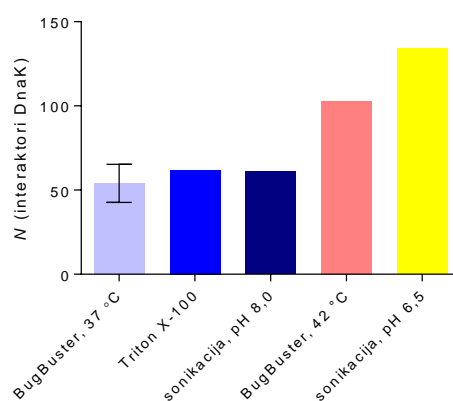


**Slika 49.** Istraživanje različitih uvjeta lize stanica uz pomoć surfaktanata. **A)** Usporedba efikasnosti lize u staničnim ekstraktima uz uporabu komercijalne otopine za lizu stanica *BugBuster* i lizonaze ili pufera za lizu stanica (50 mmol/L Tris/HCl, pH = 8,0, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, glicerol ( $\phi = 10\%$ )) uz dodatak Tritona X-100 u volumnom udjelu 0,05-0,5 % s dodatkom lizonaze ili kombinacije lizozima (0,1 mg/mL) i Dnaze (0,5 mg/mL) uz trajanje lize od 30 min do 1 h. **B)** Usporedba efikasnosti lize u staničnim ekstraktima uz uporabu komercijalne otopine *BugBuster* i lizonaze ili pufera za lizu stanica (25 mmol/L Tris/HCl, pH = 8,0, 150 mmol/L NaCl, 0,5 mmol/L EDTA, glicerol ( $\phi = 10\%$ ), Triton X-100 ( $\phi = 0,2\%$ ), 0,5 mg/mL Dnaza) uz različite koncentracije lizozima u rasponu od 1-1 mg/mL u trajanju od 30 min. **C)** Usporedba efikasnosti lize u staničnim ekstraktima i talozima stanica uz uporabu komercijalne otopine *BugBuster* i lizonaze ili pufera za lizu stanica (25 mmol/L Tris/HCl, pH = 8,0, 150 mmol/L NaCl, 0,5 mmol/L EDTA, glicerol ( $\phi = 10\%$ ), 0,5 mg/mL Dnaza, 0,2 mg/mL lizozim) uz dva različita surfaktanta: Triton X-100 (TX) i NP-40 (NP) u dva različita volumna udjela (0,2 i 0,5 %) u trajanju 15 min.

Utvrđeno je da je dodatak lizozima nužan za efikasnu lizu stanica, ali dovoljno ga je dodati u koncentraciji 0,2 mg/mL. Uz Triton X-100 ispitana je efikasnost surfaktanta NP-40 tijekom lize stanica u različitim volumnim udjelima (slika 49 C). NP-40 i Triton X-100 u volumnim

udjelima 0,2-0,5 % slično su efikasni dajući proteinske ekstrakte u koncentraciji 17-20 mg/mL što je usporedivo s koncentracijom proteina u komercijalnoj otopini za lizu *BugBuster* u kombinaciji s lizonazom.

Na temelju eksperimenata s optimizacijom lize pufer s Tritonom X-100 ( $\varphi = 0,2\%$ ) izabran je za daljnje eksperimente. Isti pufer bez Tritona X-100 upotrijebljen je za testiranje lize sonikacijom. Kao treći pufer odabran je komercijalni *BugBuster* u kombinaciji s lizonazom. Navedena tri načina lize upotrijebljena su za izolaciju interaktora DnaK i njihovu identifikaciju i kvantifikaciju LC-MS/MS-om (slika 50).



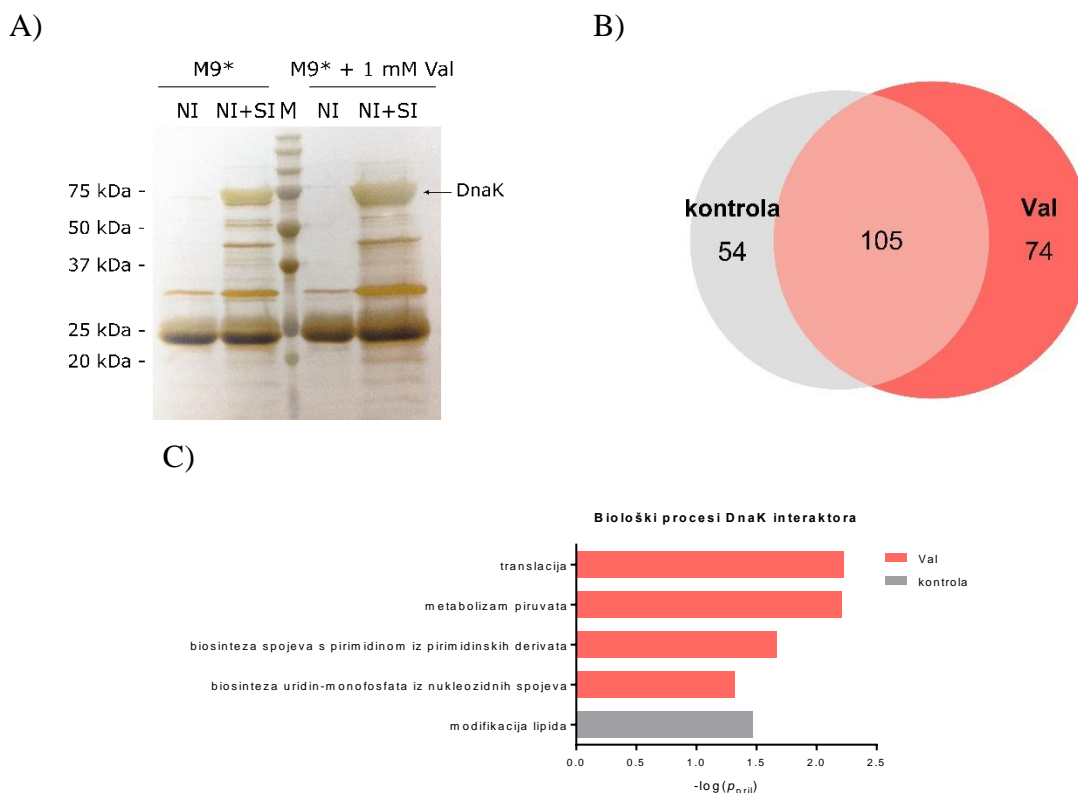
**Slika 50.** Broj interaktora DnaK u različitim uvjetima lize stanica. Stanice su lizirane komercijalnom otopinom *BugBuster* uz dodatak lizonaze pri 37 °C ili 42 °C, u puferu (25 mmol/L Tris/HCl, pH = 8,0, 150 mmol/L NaCl, 0,5 mmol/L EDTA, glicerol ( $\varphi = 10\%$ ), 0,5 mg/mL Dnaza, 0,2 mg/mL lizozim, 50 U/mL apiraza, 1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L  $\beta$ -merkaptetanol) i lizu sonikacijom (4 x 30 s sa 30 s pauze na ledu) ili u puferu navedenog sastava koji je uz to sadržavao i Triton X-100 ( $\varphi = 0,2\%$ ). Stanice su lizirane i sonikacijom u puferu nižeg pH (20 mmol/L fosfatni pufer, pH = 6,5, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1x *cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, 10 mmol/L  $\beta$ -merkaptetanol, 50 U/mL apiraza, lizonaza).

U sva tri uvjeta lize, broj identificiranih interaktora DnaK bio je sličan, u rasponu od 54 do 62 interaktora. Uvođenjem toplinskog stresa 2 h prije lize stanica, broj interaktora narastao je na 103, a ukoliko je sonikacija provedena u puferu pH = 6,5 i uz koncentraciju kalcijevih iona od 5 mmol/L (uvjeti pri koji kojima apiraza optimalno radi) broj interaktora skočio je na 134. S obzirom da je za ozbiljnije statističke analize i usporedbu broja i vrste interaktora u različitim uvjetima idealno imati što veći broj interaktora, odabrana je kombinacija lize stanica sonikacijom pri pH = 6,5 uz uzgoj stanica pri 42 °C 2 h prije lize.

#### 4.4.3. Izolacija šaperona DnaK u uvjetima toplinskog stresa i mistranslacije

Sojevi ED<sup>-</sup> i ED<sup>-</sup> dnaK\_His uzgajani su u M9\* mediju bez i sa 1 mmol/L valinom. Bakterije su najprije uzgajane pri 37 °C, a zatim 2 h pri 42 °C do eksponencijalne faze rasta (OD<sub>600</sub> = 0,6). Stanice su lizirane sonikacijom u fosfatnom puferu (pH = 6,5). Nakon toga, pH je namješten na 8,0 i proveden je postupak izolacije interaktora DnaK na Ni-NTA koloni (slika

46, slika 51 A). Proteini čiji je omjer intenziteta u uzorku NI+SI 4 puta veći nego u NI u dvije od tri replike ili koji su identificirani samo u NI+SI uzorku u 2 od 3 replike određeni su kao interaktori DnaK i korišteni u daljnjoj analizi. U uvjetima kanonske mistranslacije identificirano je 179, a u kontrolnim uvjetima 159 interaktora (slika 51 B, dodatna tablica 3). Većina identificiranih interaktora poklapa se između dva uvjeta (oko 100). Mistranslacija je dovela do relativno malog povećanja broja interaktora (za 13 %).



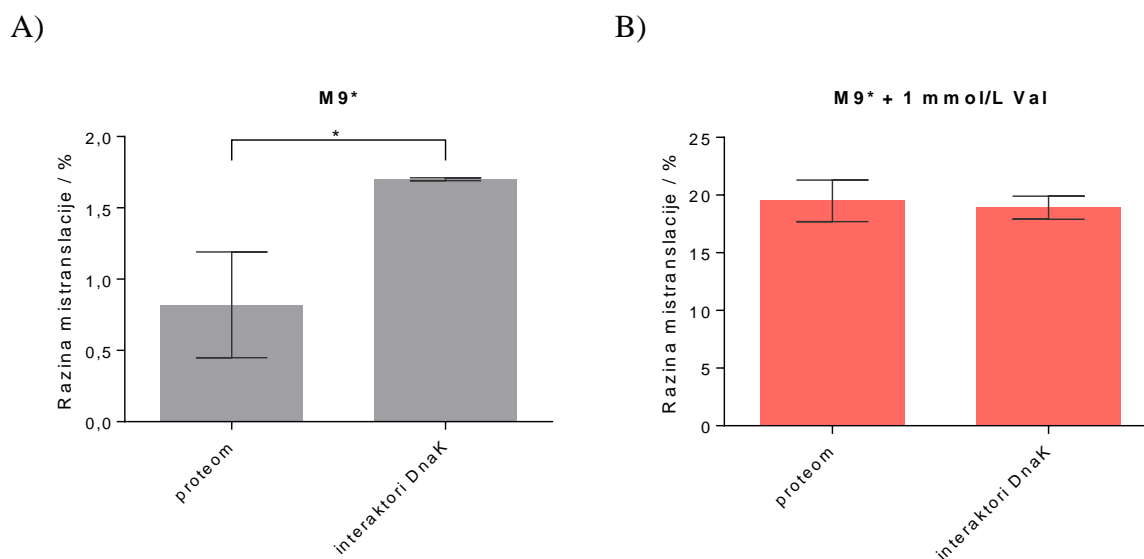
**Slika 51. A)** Analiza proteina u eluatu nakon afinitetne kromatografije na Ni-NTA staničnog ekstrakta soja ED- (NI) odnosno ED- dnaK\_His (NI+SI). Sojevi su uzgajani u dva različita medija M9\* sa ili bez 1 mmol/L valina. Proteini su vizualizirani srebrom. Uzorak NI sadrži nespecifične, a NI+SI nespecifične i specifične interaktore DnaK. **B)** Vennov dijagram prikazuje preklapanje interaktora u kontrolnim i mistranslatirajućim (Val) uvjetima. **C)** Analiza pripadnosti DnaK interaktora koji su specifičnih za kontrolne i mistranslatirajuće uvjete pojedinom biološkom procesu uz uporabu internetskog alata *GeneCodis4*.

Kako bi se utvrdili biološki procesi koji su najviše pogođeni mistranslacijom, provedena je analiza pripadnosti DnaK interaktora koji su specifičnih za mistranslatirajuće uvjete pojedinom biološkom procesu uz uporabu internetskog alata *GeneCodis4* [135]. Interaktori DnaK koji se specifično pojavljuju u uvjetima Ile → Val mistranslacije spadaju proteini koji sudjeluju u translaciji (aminoacilaciji tRNA), metabolizmu piruvata i biosintezi spojeva s pirimidinom iz pirimidinskih derivata (engl. *pyrimidine salvage*). Navedeno sugerira kako mistranslacija najviše pogađa proteine koji sudjeluju u translaciji što se poklapa s globalnim utišavanjem

ekspresije proteina uključenih u metaboličke procese u stanici (slika 43 B i D) i inhibicijom rasta bakterija (slika 31).

#### 4.4.3.1. Usporedba interaktora DnaK s proteomom

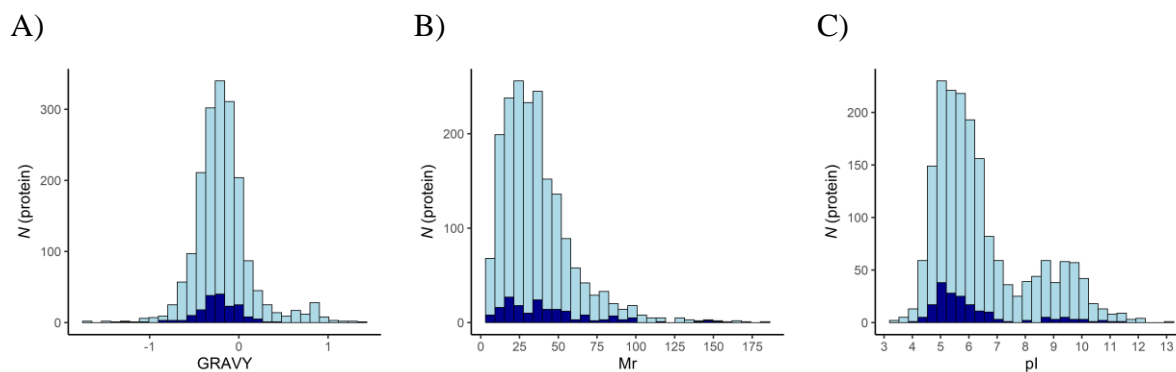
Postoji li razlika u svojstvima interaktora DnaK u odnosu na topljivi proteom? Uspoređena je razina mistranslacije proteoma i interaktora DnaK kako bi se utvrdilo jesu li među DnaK interaktorima preferentno proteini s višom razinom mistranslacije (slika 52). Takav trend vidljiv je u kontrolnim (slika 52 A), ali ne i u mistranslatirajućim uvjetima (slika 52 B).



**Slika 52.** Usporedba razine mistranslacije u proteomu i interaktorima DnaK nakon uzgoja sojeva ED<sup>-</sup> i ED<sup>-</sup> dnaK\_His u M9\* (A) ili M9\* + 1 mmol/L Val (B). \*\* označava statistički signifikantnu razliku određenu t-testom ( $p < 0,01$ ).

U uvjetima gdje je globalna razina mistranslacije relativno mala, može se vidjeti zasićenje mistranslatiranih proteina na DnaK, međutim s porastom razine mistranslacije u proteomu stanice dolazi do gubitka tog efekta.

Kako bi se vidjelo stupa li DnaK preferentno u interakciju s proteinima specifičnih fizikalnih svojstava, uspoređena su interaktori DnaK i proteom stanice s obzirom na izoelektričnu točku, molekulsku masu i hidrofobnost (slika 53). Međutim, dobiveni podaci ukazuju na široku supstratnu specifičnost šaperona DnaK neovisno o mistranslaciji.

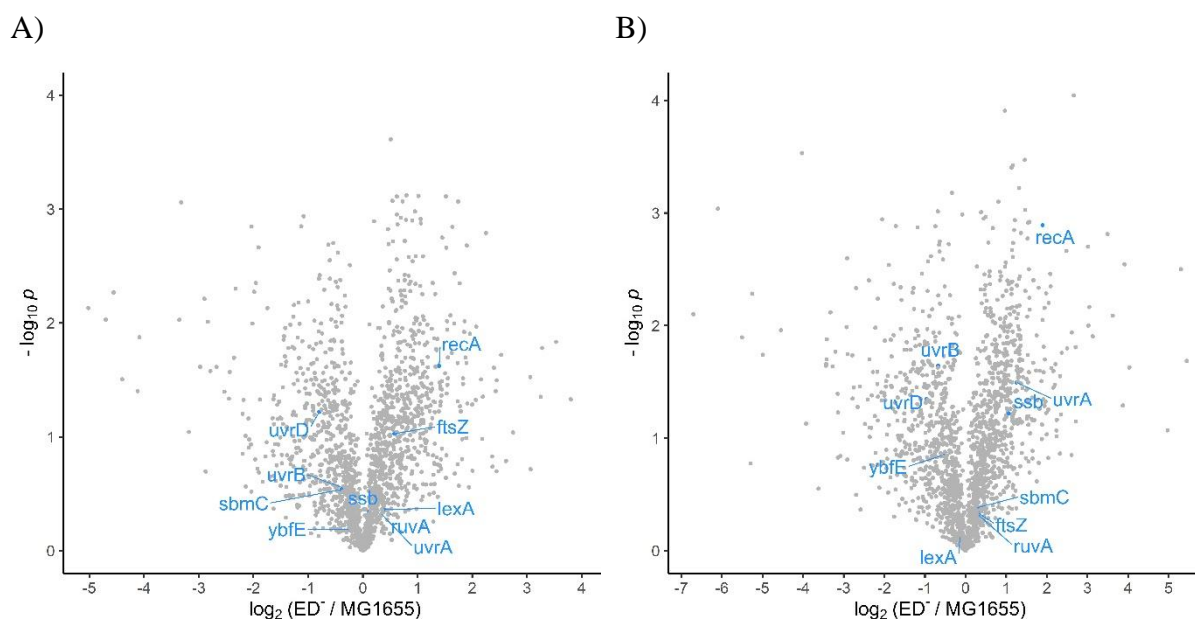


**Slika 53.** Distribucija proteina u proteomu (svijetloplavo) i DnaK interaktora (tamnoplavo) u mistranslatirajućim uvjetima s obzirom na hidrofobnost (A), molekulsku masu (B) i izoelektričnu točku (C).

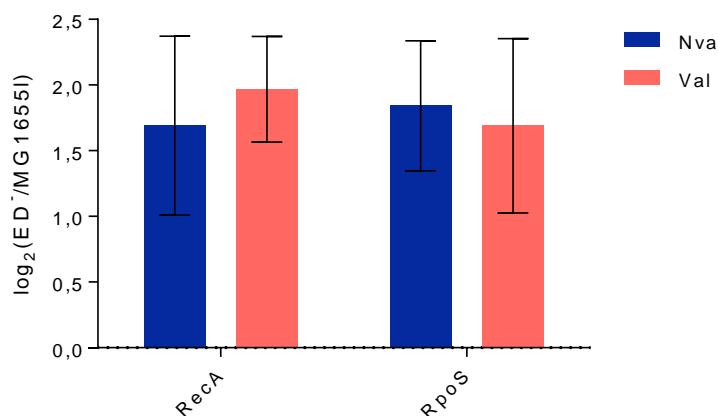
## 4.5. Stanični odgovor na mistranslaciju u stacionarnoj fazi rasta

### 4.5.1. Mistranslacija inducira SOS-odgovor i generalni odgovor na stres

Mistranslacija valinom i norvalinom uzrokuje filamentaciju u stacionarnoj fazi rasta (slika 35). Filamentacija bakterije *E. coli* povezuje se s SOS-odgovorom [152], stoga je ispitana ekspresija proteina koji sudjeluju u SOS-odgovoru. Sojevi ED<sup>-</sup> i MG1655 uzgojeni su do stacionarne faze rasta u tri različita medija: M9\*, M9\* + 1 mmol/L Val, M9\* + 1 mmol/L Nva. Određena je razina mistranslacije u svim uvjetima (slika 34 B). ED<sup>-</sup> u stacionarnoj fazi rasta u uvjetima rasta s norvalinom ima razinu mistranslacije (15 ± 3) %, a s valinom (23 ± 2) %. Na temelju usporedbe ekspresije proteina u sojevima ED<sup>-</sup> i MG1655 u istim uvjetima rasta, napravljeni su odgovarajući V-grafovi i određena diferencijalna ekspresija proteina koji sudjeluju u SOS-odgovoru [159] (slika 54). Od svih proteina koji sudjeluju u SOS-odgovoru najsignifikantniji je utjecaj na protein RecA koji je ujedno induktor SOS-odgovora [152]. Ekspresija RecA povećana je 3-4 puta u ED<sup>-</sup> u odnosu na MG1655 u mistranslatirajućim uvjetima (slika 55), što upućuje na indukciju SOS-odgovora. Ostali proteini manje su signifikantno diferencijalno eksprimirani. Osim povećane ekspresije RecA, u stanicama je uslijed mistranslacije primijećena povišena ekspresija RpoS (slika 55). RpoS je sigma-podjedinica RNA-polimeraze koja ima glavnu ulogu u stacionarnoj fazi rasta i u regulaciji odgovora na stres (engl. *general stress response*). U uvjetima stacionarne faze rasta, RpoS bi trebao biti jednako eksprimiran i u ED<sup>-</sup> i u MG1655 pa njegova povišena ekspresija u ED<sup>-</sup> ukazuje na indukciju odgovora na stres koja je drukčija od toplinskog odgovora na stres koji se javljao u eksponencijalnoj fazi rasta. Niti RecA niti RpoS nisu signifikantno diferencijalno eksprimirani tijekom eksponencijalne faze rasta što upućuje na to da su SOS-odgovor i odgovor na stres specifični odgovori stanice na dugotrajnu izloženost mistranslaciji na izoleucinskim položajima.



**Slika 54.** V-graf prikazuje diferencijalnu ekspresiju proteina u soju ED<sup>-</sup> i MG1655 uzgajanom u M9\* mediju s 1 mmol/L norvalinom (A) i valinom (B). Plavo su prikazani proteini koji sudjeluju u SOS-odgovoru stanice.



**Slika 55.** Povišenje ekspresije proteina RecA i RpoS u soju ED<sup>-</sup> u odnosu na MG1655 uslijed dodatka 1 mmol/L norvalina (Nva) i valina (Val). Stupići prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju za 3 tehničke replike.

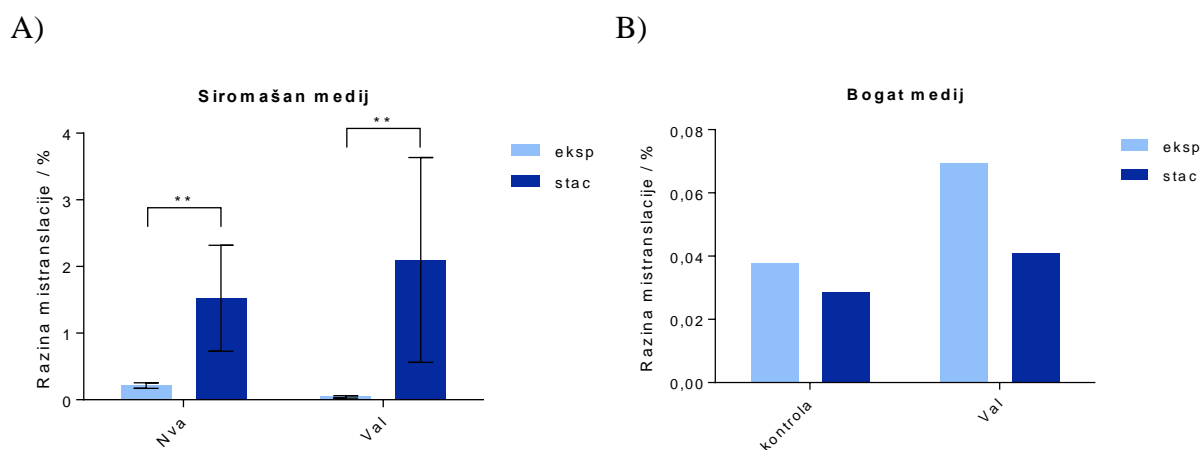
#### 4.5.2. Mistranslacija u stacionarnoj fazi rasta divljeg tipa bakterije *Escherichia coli* i usporedba s ostalim organizmima

Razina mistranslacije u soju MG1655 u stacionarnoj fazi uslijed uzgoja s 1 mmol/L norvalinom i valinom iznosi  $(1,5 \pm 0,6)$  % odnosno  $(2 \pm 1)$  % što je usporedivo s razinom mistranslacije u soju ED<sup>-</sup> u kontrolnim uvjetima u eksponencijalnoj fazi rasta koja iznosi  $(3,1 \pm 0,4)$  %. Navedene razine mistranslacije u MG1655 za red veličine su više nego u eksponencijalnoj fazi rasta (slika 56 A).



Zbog čega divlji tip bakterije ima tako visoke razine mistranslacije u stacionarnoj rasti? Jedan od razloga mogao bi biti nepovoljan omjer valina i izoleucina koji se u nutritivno siromašnom mediju znatno povisuje kako bakterije rastu u mediju i troše dostupan izoleucin. Koncentracija izoleucina u stanici je oko 25 puta manja od valina [9] i valin kao jedan od najzastupljenijih metabolita u stanici predstavlja stalnu prijetnju točnosti translacije na izoleucinskim pozicijama. Iako MG1655 može sintetizirati BCAA moguće da je da u dovoljnoj mjeri ne uspijeva zadovoljiti potrebe za izoleucinom i da u tom slučaju mistranslacija predstavlja kompromis između stanične smrti i pogrešne translacije.

Kako bi se ispitala ova hipoteza, napravljena je usporedba razine mistranslacije divljeg tipa bakterije u nutritivno bogatom LB mediju sa i bez dodanog valina koncentracije 5 mmol/L (slika 56 B). Viša razina mistranslacija ne postoji u stacionarnoj fazi u nutritivno bogatom mediju.



**Slika 56.** Razina mistranslacije u proteomu soja MG1655 u: **A)** M9\* mediju s valinom ( $c = 1$  mmol/L) – Val ili norvalinom ( $c = 1$  mmol/L) – Nva do eksponencijalne ( $OD_{600} = 0,5$ ) ili stacionarne faze rasta (nakon 24 h) pri 37 °C. Eksperimenti su izvedeni u najmanje 3 tehničke replike. Visina stupića označava srednju vrijednost, a pogreška standardnu devijaciju. **B)** LB mediju bez (kontrola) ili s valinom ( $c = 5$  mmol/L) – Val.

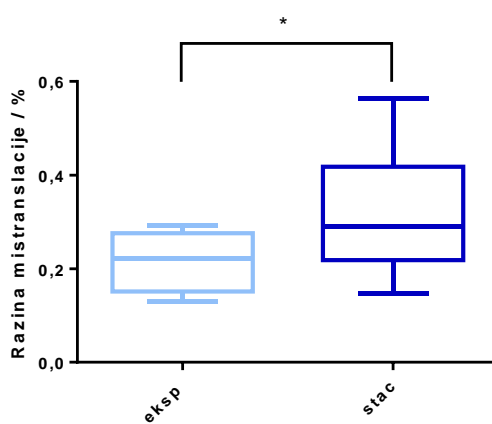
Uz pretpostavku da je valin jedan od najzastupljenijih metabolita u stanici, efekt razlike u mistranslaciji na izoleucinskim pozicijama između eksponencijalne i stacionarne faze rasta trebao bi se vidjeti i u drugim organizmima. U tu svrhu, upotrijebljeni su javno dostupni podaci proteoma iz različitih organizama iz proteomske baze podataka *ProteomeXChange* navedenih u tablici 12 za koje su postojali analizirani proteomi i u eksponencijalnoj i u stacionarnoj fazi rasta. Odgovarajući sirovi podaci ponovno su procesirani uz uporabu odgovarajuće baze podataka i određena je razina mistranslacije na izoleucinskim pozicijama.

Većina analiziranih organizama imala je vrlo nisku razinu mistranslacije koja je odgovarala detekciji vrlo malog broja mistranslatiranih peptida (manje od 10), međutim u dijelu analiziranih organizama broj detektiranih mistranslatiranih peptida bio je veći. Tu se posebno ističe bakterija *Staphylococcus aureus* s više od 100 mistranslatiranih peptida. S obzirom da vrlo niska razina mistranslacije nije prikladna za kvantifikaciju (jer razliku između eksponencijalne i stacionarne faze rasta u nekim slučajevima čini 1 do 2 peptida), kako bi se usporedila razina mistranslacije u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta u različitim organizmima, odabrani su samo oni organizmi gdje je postotak mistranslacije iznosio iznad 0,1 % (Podebljani u tablici 12).

**Tablica 12.** Popis organizama iz baze podataka *ProteomeXChange* i razina mistranslacije u proteomu organizma izoliranom u eksponencijalnoj ili stacionarnoj fazi rasta. Podebljano su označeni organizmi u kojima je razina mistranslacije u obje faze bila iznad 0,1 %.

Organizam	Razina mistranslacije / %	
	Eksponencijalna faza	Stacionarna faza
<i>Actinoplanes</i> sp SE50/110	0,037	0,052
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	0,104	0,079
<b><i>Bacillus subtilis</i> 168</b>	<b>0,158</b>	<b>0,270</b>
<b><i>Brucella abortus</i> str 2308a</b>	<b>0,130</b>	<b>0,146</b>
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> CBDB1	0,042	0,033
<b><i>Escherichia coli</i> MG1655 K-12</b>	<b>0,292</b>	<b>0,564</b>
<b><i>Haloferax vulcanii</i> DS2</b>	<b>0,235</b>	<b>0,309</b>
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> S6	0,057	0,040
<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	0,050	0,049
<b><i>Pseudomonas putida</i> F1</b>	<b>0,208</b>	<b>0,242</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i> NTCT 8325</b>	<b>0,270</b>	<b>0,369</b>

Ukoliko u navedenom setu organizama usporedimo razinu mistranslacije moguće je uočiti mali, ali značajan trend više razine mistranslacije u stacionarnoj fazi rasta u svakom pojedinom organizmu (slika 57).



**Slika 57.** Usporedba razine mistranslacije u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta za organizme iz tablice 11 čija je razina mistranslacije u obje faze iznad 0,1 %. \* označava signifikantnu razliku ( $p < 0,05$ ) određenu sparenim t-testom

## § 5. RASPRAVA

### 5.1. Dodatak norvalina smanjuje unos aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom u stanicu

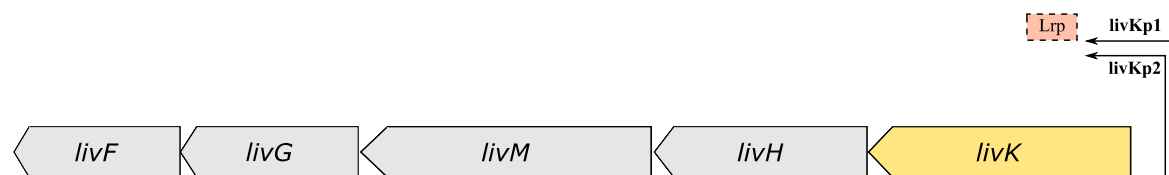
Stanice imaju mehanizme kojima mogu odrediti promjene u koncentraciji aminokiselina u svojoj okolini i prema tome prilagoditi njihovu biosintezu [160]. Visoka izvanstanična koncentracija aminokiseline obično rezultira povećanom unutarstaničnom koncentracijom i može smanjiti ekspresiju gena koji kodiraju proteine uključene u unos te aminokiseline u stanicu [161]. U ovome radu pokazano je da dodatak norvalina u medij za uzgoj stanica smanjuje razinu periplazmatskih proteina LivJ i LivK (slika 29 A) koji su uključeni u unos aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom (BCAA) [150]. U divljem tipu bakterije *E. coli* (MG1655) razina LivJ se smanjuje 10 puta, a LivK 5 puta ukoliko se u medij doda 1 mmol/L norvalin (slika 29 A). S druge strane, valin u istoj koncentraciji ne utječe na ekspresiju LivJ, dok je količina LivK smanjena, ali u značajno manjoj mjeri (slika 29 B), što ukazuje da je efekt uzrokovan primarno dodatkom norvalina. Osim u divljem tipu, efekt smanjenja ekspresije LivJ i LivK uslijed dodatka norvalina neovisno je potvrđen i u sojevima ED<sup>-</sup> i WT ILV<sub>aux</sub> (slika 29 A).

Rezultati proteomike izravno pokazuju da u bakteriji *E. coli* uslijed dodatka norvalina dolazi do smanjenja količine LivJ/K proteina što upućuje na smanjeni unos izoleucina, leucina, valina, a vjerojatno i norvalina koji im je strukturno sličan. Međutim, i drugi primijećeni efekti idu tome u prilog. Primjerice, usporedbom razine mistranslacije soja s ugašenim popravkom pogreške poslije prijenosa u IleRS u mediju s istom koncentracijom Nva odnosno Val ( $c \geq 1$  mmol/L), razina mistranslacije Ile  $\rightarrow$  Val je uvijek viša (slika 32), u skladu s prije objavljenim rezultatima [8]. Niža razina mistranslacije Ile  $\rightarrow$  Nva u skladu je s hipotezom da se norvalin, ukoliko je u mediju prisutan u višim koncentracijama, manje unosi u stanicu. Drugi mogući razlog razlike u razini mistranslacije valinom i norvalinom je njihova razlika u diskriminacijskim faktorima u aktivaciji aminokiseline kod enzima IleRS koji za valin iznosi 159 [50], a za norvalin 239 [8], što upućuje na to da je valin nešto bolji supstrat IleRS nego norvalin. Međutim, s obzirom da su diskriminacijski faktori za ove dvije aminokiseline određeni u različitim reakcijskim uvjetima u kojima varijabilnost može iznositi i do 50 % (vidi razliku diskriminacijskih faktora IleRS za  $\alpha$ -aminobutanoat u ref. [7] i ref. [162]), upitno je do koje je mjere razlika ovih diskriminacijskih faktora signifikantna.

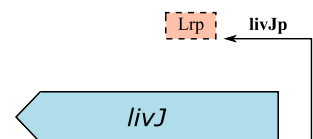
Nadalje, na smanjeni unos BCAA u stanicu uslijed dodatka norvalina upućuje i visoka toksičnost norvalina za  $ILV_{aux}$  (slika 28 A) koja je usporediva s toksičnošću za PS7066  $ILV_{aux}$  (slika 28 B). Budući da soj  $ILV_{aux}$  ne može sintetizirati BCAA zbog delecije i inaktivacije *leuB* odnosno *ilvD*, već pri koncentraciji norvalina od 1,4 mmol/L dolazi do starvacije i umiranja stanica zbog nemogućnosti unosa esencijalnih aminokiselina.

Na koji način norvalin utječe na smanjeni unos BCAA? LivJ i LivK su periplazmatske komponente ABC-transportera LIV-I odnosno LS [150]. Oba ABC-transportera imaju jednak membranski dio koji se sastoji od proteinskog kompleksa LivFHGM. Periplazmatski proteini LivJ i LivK različito vežu aminokiseline i tako reguliraju specifičnost njihovog prolaska kroz membransku komponentu ABC-transportera [150]. LivK ima visok afinitet prema leucinu, a LivJ ima afinitet prema BCAA i u manjoj mjeri prema alaninu, treoninu i serinu [163]. Gen *livK* nalazi se u operonu s *livF*, *livG*, *livM* i *livH* (slika 58 A), dok se *livJ* nalazi u zasebnom operonu u blizini (slika 58 B) [164, 165]. Transkripcija obaju operona negativno je regulirana proteinom Lrp (engl. *Leucine responsive protein*) [161].

A)



B)



**Slika 58.** Shema pozicije *livK* (A) i *livJ* (B) u genomu bakterije *Escherichia coli* K-12 MG1655. A) Shema *livKHMGF* operona. Naznačena su dva alternativna promotora. Transkripcija s promotora *livKp1* negativno je regulirana vezanjem Lrp (engl. *Leucine responsive protein*). B) Shema *livJ* operona. Transkripcija s promotora *livJp* negativno je regulirana vezanjem Lrp. Izrađeno prema shemama iz ref. [164] i [165]. Slika je napravljena u programu *Inkscape*.

Lrp je regulatorni protein koji regulira ekspresiju preko 40 proteina u bakteriji *E. coli* i među ostalim utječe na biosintezu aminokiselina, pili i asimilaciju dušika [166]. Leucin se veže na Lrp i tako ostvaruje pleiotropan utjecaj na gene pod njegovom regulacijom [166]. Vezanje leucina na Lrp može dodatno pojačati, smanjiti ili uopće ne utjecati na ekspresiju reguliranog gena u usporedbi s regulatornim učinkom koji ima apo Lrp [166]. Eksperimentalno je potvrđeno da Lrp s vezanim leucinom uzrokuje smanjenje ekspresije gena s operona *livKHMGF* i *livJ* [161]. Posljedično, visoka koncentracija leucina u stanici je signal za smanjenje unosa BCAA.

Zanimljivo je da dodatak norvalina ima veći efekt na ekspresiju LivJ koja je u potpunosti regulirana s regulatornim proteinom Lrp (slika 58 B), nego na ekspresiju LivK koja je pod kontrolom dvaju alternativnih promotora (slika 58 A) od kojih je ekspresija samo s jednog negativno regulirana s Lrp. Budući da je norvalin strukturno sličan leucinu (jedna metilenska skupina manje na bočnom ogranku) i u stanici nastaje uz pomoć istih enzima kao i leucin (slika 8) [10], lako je moguće da Lrp može vezati norvalin i da njegovo vezanje može ostvariti analogan efekt kao vezanje leucina. Međutim, radi se o hipotezi za koju je potreban direktan dokaz određivanja afiniteta Lrp prema norvalinu i dokaz o regulaciji nizvodnih gena. Ideja da bi norvalin kao nusprodukt sinteze leucina mogao imati efekt na Lrp koji je globalni regulator metaboličkih puteva u bakteriji *E. coli* je zanimljiva i vrijedna daljnjeg istraživanja.

## 5.2. Stanični odgovor na pogreške u biosintezi proteina na izoleucinskim položajima

Visoka razina mistranslacije (do 20 %) na izoleucinskim pozicijama u proteomu bakterije *E. coli* značajno utječe na ekspresiju proteina u stanici što ukazuje na važnost ispravnog ugrađivanja izoleucina za održavanje proteostaze bakterije. Osim toga, pokazano je i da divlji tip bakterije u nutritivno siromašnim uvjetima s nepovoljnim omjerom izoleucina i valina ima značajno višu razinu mistranslacije na izoleucinskim položajima u stacionarnoj fazi rasta. Bez funkcionalne domene za popravak pogreške u IleRS, razina mistranslacije u takvim uvjetima je viša i štetnija za stanicu. Mala, ali konzistentna razlika u razini mistranslacije u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta potvrđena je u drugim organizmima i vjerojatno je posljedica starvacije izoleucinom u stacionarnoj fazi i prisutnosti visoke koncentracije valina. Budući da sve poznate sekvence IleRS sadrže funkcionalnu domenu za popravak pogreške [5], moguće je da su organizmi iz svih domena života (bakterije, arheje, eukarioti) tijekom evolucije zadržali domenu za popravak pogreške IleRS kako bi onemogućili višu razinu mistranslacije u nutritivno siromašnim uvjetima.

Nekoliko eksperimenata ukazuje na višu toksičnost zamjene izoleucina neproteinogenim norvalinom (nekanonska mistranslacija) u odnosu na zamjenu proteinogenim valinom (kanonska mistranslacija). Nekanonska mistranslacija uzrokovala je diferencijalnu ekspresiju većeg broja proteina uz nižu razinu mistranslacije, veći inhibični efekt na rast stanica pri optimalnoj (u slaganju s prijašnjim rezultatima [8]) i povišenoj temperaturi. Osim toga, sâm dodatak norvalina u medij doprinosi diferencijalnoj ekspresiji proteina dovodeći do

pojačane ekspresije proteina uključenih u biosintezu aminokiselina i smanjujući ekspresiju proteina uključenih u unos BCAA.

Iz literature je poznato da niska razina mistranslacije može omogućiti stanici adaptaciju na različite vrste stresa kao što su oksidativni stres [80] i odgovor na toplinski stres [19] zbog povišene ekspresije proteina koji sudjeluju u odgovoru stanice na toplinski stres (engl. *heat-shock proteins*). U ovoj doktorskoj disertaciji vidljivo je da visoka razina mistranslacije smanjuje otpornost na izloženost letalnoj temperaturi. Prema istraživanju Leubergera i suradnika pri letalnoj temperaturi pojedini organizam gubi funkciju specifičnog seta esencijalnih proteina zbog čega dolazi do stanične smrti [167]. Viša sklonost mistranslatiranih proteina narušavanju native strukture pri visokim temperaturama [13, 154] dovodi do bržeg gubitka njihove funkcije i posljedično brže stanične smrti. Kad govorimo o adaptivnim učincima mistranslacije, u pravilu se radi o niskim razinama mistranslacije. Porastom razine mistranslacije dolazi do granice iznad koje štetni učinci mistranslacije (strukturna destabilizacija proteoma) prevladavaju potencijalne koristi (adaptaciju na stres).

Broj diferencijalno eksprimiranih proteina uzrokovan nekanonskom mistranslacijom (233 proteina) usporediv je s rezultatom dobivenim za mistranslaciju Ala → Ser (264 proteina) ukoliko upotrijebimo slične statističke kriterije (FDR = 5 %, dvostruko povećanje/smanjenje ekspresije) [21]. Drugim riječima, 17 %-tna razina nekanonske mistranslacije uzrokuje diferencijalnu ekspresiju proteina u bakteriji *E. coli* u sličnom razmjeru kao i mistranslacija Ala → Ser koju su primijetili Kelly i suradnici [21]. Međutim, dok je mistranslacija na izoleucinskim pozicijama primarno rezultirala povećanjem ekspresije šaperona i proteaza, isti efekt nije primijećen u istraživanju Kelly i suradnika [21]. Pažljivijom analizom podataka o mistranslaciji Ala → Ser može se opaziti blago povišena ekspresija proteina GrpE (dio šaperonskog sustava Hsp70 u kojem je glavna komponenta DnaK) i disagregaze ClpB, ali u mnogo manjoj mjeri (1,8-1,9 puta) nego u slučaju izoleucinske mistranslacije ( $\geq 4$  puta) [21]. Mistranslacija Ala → Ser uzrokuje pojačanu ekspresiju proteina uključenih u razne metaboličke puteve, dok izoleucinska mistranslacija u pravilu utišava metabolizam stanice. Navedene razlike upućuju na različite mehanizme djelovanja ovih dvaju vrsta mistranslacije.

Primijećene razlike između mistranslacija Ala → Ser i Ile → Nva mogu biti izazvane različitim razinama mistranslacije u proteomu stanice. Nažalost, razina mistranslacije nije određena u eksperimentima koje su napravili Kelly i suradnici [21], a s obzirom da se njihovi rezultati eksperimentalnih mjerenja ne nalaze u bazi podataka *ProteomeXChange*, nije ih bilo

moguće naknadno odrediti. Na temelju nekih odrednica može se pretpostaviti da je razina Ala → Ser mistranslacije niža od izmjerene razine izoleucinske mistranslacije (20 %). Jedan razlog za to je da je alanil-tRNA-sintetaza (AlaRS) oko 300 puta selektivnija prema alaninu u odnosu na serin [168], dok je IleRS oko 200 puta selektivnija prema izoleucinu u odnosu na valin/norvalin [8]. Drugi, važniji razlog je omjer pripadne u odnosu na nepripadnu aminokiselina u mediju za uzgoj bakterija. Omjer serina i alanina u LB mediju je puno manji (3:2) nego omjer norvalina/valina i izoleucina u M9\* mediju (10:1). Iz svega navedenog, može se zaključiti da je mistranslacija Ala → Ser opasnija za stanicu jer izaziva proteomski odgovor sličnog razmjera kao izoleucinska mistranslacija uz (pretpostavljeno) nižu razinu mistranslacije. Opaženi efekt je razumljiv s obzirom da je alanin jedna od najzastupljenijih aminokiselina u bakterijskim proteinima, za razliku od izoleucina koji je gotovo dvostruko manje zastupljen [75, 169]. Isto tako, mistranslacija Ala → Ser dovodi do promjene u polarosti i reaktivnosti supstituirane aminokiseline, dok je u slučaju izoleucinske mistranslacije zamjena kemijski vrlo slična. Prema tome, bakterija *E. coli* neočekivano dobro podnosi visoke razine mistranslacije izazvane zamjenom aminokiseline koja uglavnom ima strukturnu funkciju u proteinima.

Izoleucinska mistranslacija izaziva stres u stanici i uzrokuje pojačanu ekspresiju glavnih šaperona i proteaza u bakteriji *E. coli*. Ranije je pokazano da je proteolitička razgradnja mistranslatiranih proteina ključna za preživljavanje bakterije u mistranslatirajućim uvjetima [16, 170]. S druge strane, šaperonski odgovor na različite vrste mistranslacije je kompleksniji i ovisi o vrsti aminokiselinske supstitucija i tipu organizma. Kao što je komentirano u gornjem odlomku, mistranslacija Ala → Ser ima vrlo slabi efekt na ekspresiju šaperona u bakteriji *E. coli* [21], dok u istoj bakteriji supstitucija Asn → Asp uzrokuje povećan broj transkripata DnaK i GroEL [16]. Nasuprot tome, mistranslacija Ala → Ser u eukariotskom organizmu *Saccharomyces cerevisiae* utišava ekspresiju šaperona čime povećava osjetljivost stanice na povišenu temperaturu [26].

Mistranslacija na izoleucinskim položajima u proteomu bakterije *E. coli* uzrokuje smanjenu ekspresiju proteina uključenih u transport i homeostazu željeznih iona te različitih metaboličkih procesa u stanici. Prema tome, usporavanje metabolizma i povećanje ekspresije proteina koji sudjeluju u održavanju proteostaze stanice je način na koji se *E. coli* nosi s mistranslacijskim stresom. Na koji način mistranslacija uzrokuje promjene u metabolizmu željeznih iona nije sasvim jasno. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* dodatak aminokiseline u



medij smanjuje unutarstaničnu koncentraciju i unos željeznih iona [171], međutim takav efekt nije primijećen u analiziranim proteomima *E. coli* (MG1655).

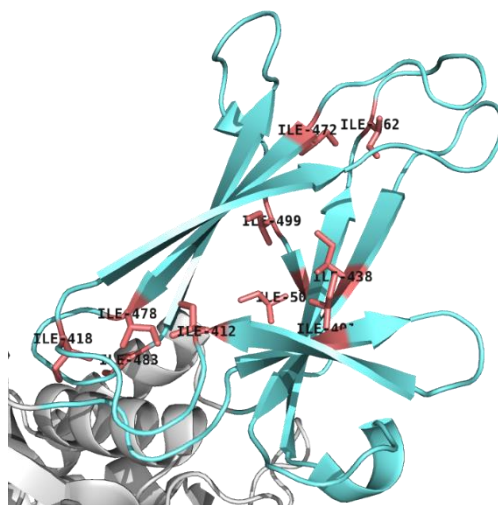
Pokazano je da bakterija *E. coli* može preživjeti razinu mistranslacije do 10 % [16], a ovdje je pokazana cjelovita proteomska analiza da *E. coli* može podnijeti vrlo visoke razine mistranslacije koje u topljivom proteomu postižu vrijednosti do 20 %. Pokazani efekt ukazuje na to da bakterija pokazuje visoku tolerantnost prema supstituciji strukturne aminokiseline koja nema direktnu ulogu u enzimskoj katalizi. Također pokazuje da bakterijska otpornost na mistranslaciju značajno ovisi o razini mistranslacije i vrsti aminokiselinske zamjene.

### **5.3. Izoleucinska mistranslacija destabilizira proteine koji sudjeluju u translacijskim procesima**

Mistranslacija je nasumičan proces, zbog čega se isti protein u stanici može naći u nekoliko različitih formi ovisno o tome gdje se u primarnom slijedu dogodila supstitucija izoleucina valinom/norvalinom. Zamjena na jednom mjestu u primarnom slijedu aminokiselina može dovesti do strukturnih promjena, a na drugom ne. Stoga je konačni, uprosječni rezultat mistranslacije na isti protein kompleksan jer ovisi o udjelu strukturno destabiliziranih i intaktnih inačica tog proteina. Na taj način određeni udio nekog proteina treba pomoć šaperona u smatanju. Osim toga, u mistranslatirajućim uvjetima sâm šaperon DnaK može sadržavati supstitucije na dijelu C-terminalne domene s kojom ostvaruje interakciju sa supstratima (dvije antiparalelne  $\beta$ -ploče, slika 59). Domena se sastoji od oko 110 aminokiselina, od kojih je čak 10 izoleucina (slika 59), što znači da u uvjetima s povišenom razinom mistranslacije, nužno dolazi i do utjecaja DnaK na njegovu interakciju sa supstratom. S obzirom da je u ovoj disertaciji promatran specifičan utjecaj zamjene izoleucina valinom, gdje obje aminokiseline imaju slična kemijska svojstva i strukturne preference [12, 13], navedena zamjena ne bi trebala značajno utjecati na sposobnost vezivanja supstrata, što je i vidljivo utoliko što su interaktori uspješno izolirani i u kontrolnim i u mistranslatirajućim uvjetima.

Pri niskim razinama mistranslacije u stanici, interaktori šaperona DnaK imaju višu razinu mistranslacije od prosjeka. Međutim, u uvjetima s visokom razinom mistranslacije ta razlika se gubi, vjerojatno jer dolazi do zasićenosti DnaK mistranslatiranim proteinima čime je stanični aparat za održavanje proteostaze preopterećen i uslijed čega dolazi do nastanka proteinskih agregata [127]. DnaK u suradnji sa staničnom disagregazom ClpB pomaže u

otapanju agregata [172] i detektiran je i u proteinskim agregatima nastalim uslijed mistranslacije na izoleucinskim pozicijama [127].



**Slika 59.** Struktura dvaju antiparalelnih  $\beta$ -ploča (svijetloplavo) na C-kraju proteina DnaK koje sudjeluju u vezanju supstrata (pdb kôd: 4B9Q). Istaknute su pozicije izoleucina (crveno). Slika je napravljena u programu *PyMOL*.

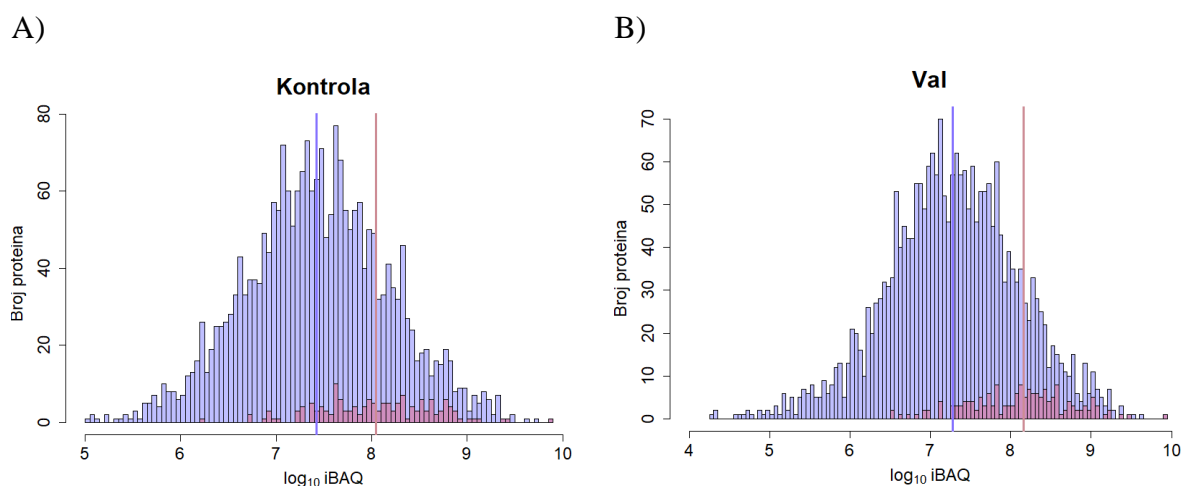
Glavna posljedica izoleucinske mistranslacije je nespecifična agregacija [127]. U mistranslatirajućim uvjetima dolazi do povećanja broja agregiranih proteina kao i razine mistranslacije u agregatima koja je konzistentno viša nego u topljivom proteomu. Ekspresija disagregaze ClpB povišena je oko 5 puta u mistranslatirajućim uvjetima (slika 44). Delecijom *clpB* u soju ED<sup>-</sup> dolazi do pojačane agregacije proteina u uvjetima mistranslacije i dodatnog povišenja razine mistranslacije u agregatima što upućuje na njezin važan doprinos solubilizaciji mistranslatiranih proteina [127].

Izoleucinska mistranslacija dovodi do manjih promjena u broju i vrsti interaktora šaperona DnaK. Među interaktorima koji su specifično detektirani u uvjetima kanonske mistranslacije preferentno se nalaze proteini koji sudjeluju u translacijskim procesima u stanici (AlaS, AspS, FusA, LysS, RplE, RplJ, RplR, SelB, Sra, TrpS).

Visoka razina mistranslacije na izoleucinskim pozicijama imala je relativno mali utjecaj na broj ili vrstu interaktora glavnog bakterijskog šaperona DnaK unatoč njegovoj povišenoj ekspresiji. Postoji nekoliko potencijalnih razloga zašto bi to moglo biti tako.

Budući da je DnaK detektiran u agregatima uslijed mistranslacije [127], njegova glavna uloga mogla bi biti suradnja sa staničnom disagregazom ClpB tijekom solubilizacije agregata [172]. Prema tome, dio njegovih interaktora mogli bi biti proteinski agregati kojih nema u topljivoj frakciji. Osim toga, moguće je da mistranslacija destabilizira interaktore DnaK koji

spadaju u njegove standarne interaktore, tj. među proteine sklone gubitku native strukture. I konačno, moguće je da se tijekom postupka izolacije interaktora DnaK preferentno izoliraju zastupljeniji proteini čime se gubi osjetljivost za detekciju nisko zastupljenih proteina koji bi dodatno doprinosili razlici u interaktorima u kontrolnim i mistranslatirajućim uvjetima. Naime izolirani interaktori DnaK su visoko zastupljeni u proteomu bakterije *E. coli* (slika 60), u prosjeku za red veličine više od prosječno zastupljenog proteina u bakteriji *E. coli*.



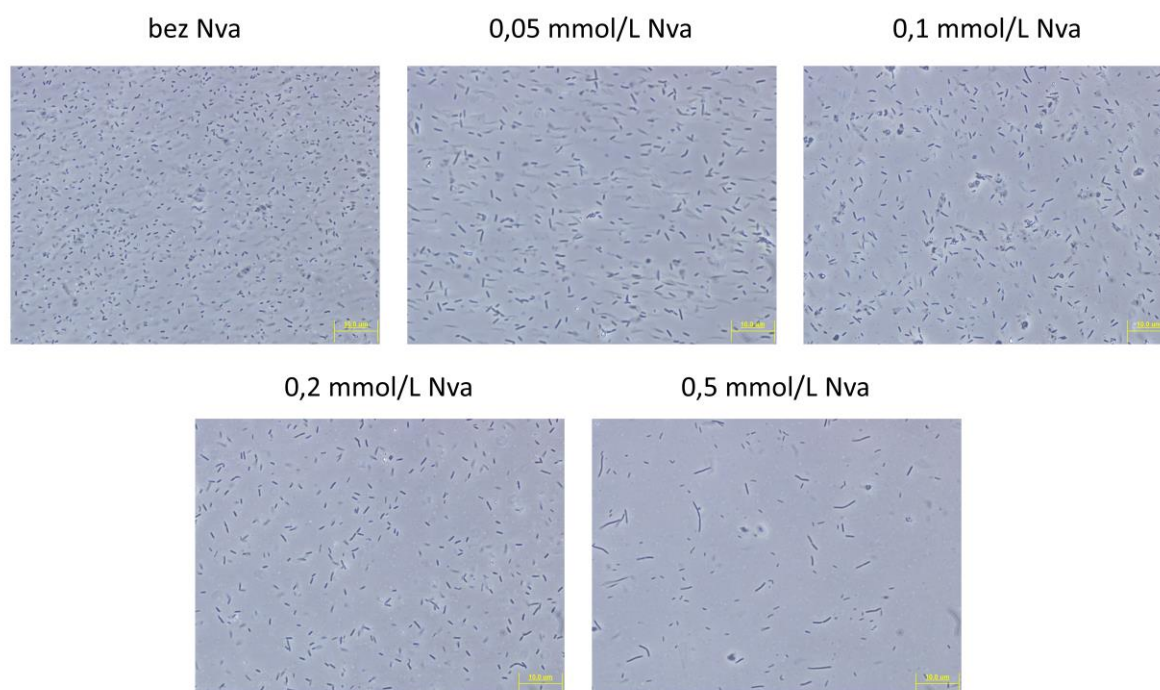
**Slika 60.** Distribucija zastupljenosti proteina u proteomu (ljubičasto) i među interaktorima DnaK (roza) u kontrolnim uvjetima (A) i uvjetima gdje dolazi do mistranslacije Ile → Val (B). Ravnim linijama naznačeni su medijani distribucija. U oba slučaja izolirani interaktori šaperona DnaK visoko su zastupljeni u proteomu bakterije *Escherichia coli* što indicira da se tijekom postupka izolacije interaktora preferentno izoliraju visoko zastupljeni proteini.

#### 5.4. Mistranslacija aktivira SOS-odgovor

Mistranslacija može promijeniti bakterijsku morfologiju, primjerice utječući na integritet stanične membrane [21] ili uzrokujući apoptozu [65]. U ovoj disertaciji pokazano je da bakterija *E. coli* koja raste u mistranslatirajućim uvjetima do stacionarne faze rasta stvara duge filamente. Filamentacija je primijećena kod nekoliko tipova mistranslacije: Ile → Val, Ile → Nva i Leu → Nva (slika 61) tako da je moguće da predstavlja generalni odgovor bakterije na mistranslacijski stres.

Filamentacija je jedan od mehanizama koji bakterijama omogućava preživljavanje u različitim uvjetima stresa (gladovanje, sniženje pH, visoki tlak, niska vlažnost, rast pri minimalnoj temperaturi rasta, visoka razina CO<sub>2</sub>, antibiotici, oštećenje DNA i drugo) [173, 174]. U tipičnim uvjetima rasta, pojedina vrsta bakterije ima strogo određene dimenzije zbog čega se one i koriste u klasičnom opisu pojedine bakterijske vrste [152]. Filamentacija se događa u uvjetima gdje stanica raste, ali se ne dijeli, što rezultira nastankom dugih filamenata

koji nose po nekoliko kopija genetičkog materijala [152]. Dužina filamenata u prosjeku dostiže 10-50 puta veću dužinu od normalne bakterije. Svrha inhibicije stanične diobe je sprječavanje nastanka stanica kćeri s oštećenim genetskim materijalom. Osim toga, filamentacija bakteriji može poslužiti kao mehanizam obrane. Filamenti bakterije *E. coli* u epitelnim stanicama mokraćnog mjehura pacijenata s urinoinfekcijom otporni su na fagocitozu stanica imunološkog sustava (neutrofila). Filamentacija je mogući uzrok rezistencije bakterije *Mycobacterium tuberculosis*, uzročnika tuberkuloze, na tretman različitim antibioticima.



**Slika 61.** Uzgoj soja MG1655 *leuS* D345A u M9\* mediju s različitim koncentracijama norvalina (Nva) do stacionarne faze rasta. Mutacija D345A onemogućuje hidrolitičku aktivnost u domeni za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze, što u kombinaciji s visokim koncentracijama norvalina dovodi do supstitucije leucina norvalinom u proteomu bakterije [11]. Pri višim koncentracijama norvalina dolazi do filamentacije u stacionarnoj fazi rasta.

Postoji više različitih mehanizama koji uzrokuju filamentaciju u bakterijama. Neki od njih su inhibicija proteina koji sudjeluju u sintezi peptidoglikanskog sloja (FtsI, FtsW), prekomjerna ekspresija RodZ (sudjeluje u elongaciji stanica), inaktivacija proteina FtsZ koji omogućava formiranje Z-prstena tijekom diobe stanice, inhibicija FtsZ vezanjem proteina SulA kojim se potiče SOS-odgovor stanice [174]. U ovoj disertaciji pokazano je da u stacionarnoj fazi uslijed mistranslacije dolazi do nastanka filamenata *E. coli* povezanih s prekomjerno eksprimiranim proteinom RecA. RecA se veže na jednolančanu DNA čime se aktivira i stimulira autoproteolizu LexA, transkripcijskog represora SOS-regulona, što dovodi do aktivacije SOS-odgovora [159]. SOS-odgovor uzrokovan nastankom jednolančane DNA koji u mistranslatirajućim uvjetima potencijalno nastaje zbog visoke razine mistranslacije u

replikacijskoj/transkripcijskoj mašineriji. S obzirom da tijekom indukcije SOS-odgovora dolazi do pojačane ekspresije DNA-polimeraze V (UmuCD) koja je manje vjerna [159], izloženost visokoj stopi mistranslacije ima mutageni učinak. Tome u prilog ide i ranije istraživanje u kojem su Bacher i Schimmel pokazali vezu između mutagenog učinka mistranslacije i SOS-odgovora [91]. Stanice s inaktiviranim popravkom pogreške poslije prijenosa u IleRS na hranjivim pločama s ciprofloksacinom tijekom 2 dana razvile su značajan broj kolonija rezistentnih na antibiotik, za razliku od divljeg tipa bakterije [91]. Broj rezistentnih mutanata znatno se smanjuje ukoliko stanice s inaktiviranim popravkom pogreške poslije prijenosa ujedno sadrže i protein LexA s mutacijom koja mu onemogućava autoproteolizu, a time i indukciju SOS-odgovora [91]. Prema tome, moguće je da je u mistranslatirajućim uvjetima konstitutivno induciran SOS-odgovor zbog čega su stanice u takvim uvjetima intrinzično sklone uvođenju mutacija.

## § 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- PS7068 ( $\Delta ilvG-E$ ) je auksotrof samo za izoleucin i valin, a ne i za leucin.
- Soj bakterije *Escherichia coli* s deaktiviranom domenom za popravak pogreške IleRS koji je auksotrof za izoleucin, valin i leucin nije dobar modelni sustav za praćenje mistranslacije na izoleucinskim pozicijama zbog visoke toksičnosti koju izaziva dodatak norvalina u medij i koja je neovisna o mistranslaciji.
- Povišena koncentracija norvalina u mediju smanjuje ekspresiju proteina LivJ i LivK i tako smanjuje unos aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom i norvalina u stanicu.
- Norvalin kao strukturno slična aminokiselina leucinu najvjerojatnije se kao njegov analog veže na protein Lrp – globalni transkripcijski faktor u bakteriji *E. coli* – i na taj način utječe na regulaciju ekspresije brojnih gena.
- Mistranslacija na izoleucinskim pozicijama inhibira rast bakterije *E. coli* i smanjuje njezinu otpornost na toplinski stres.
- Bakterija *E. coli* unatoč inhibiciji, uspijeva rasti u uvjetima izoleucinske mistranslacije do 20 % u proteomu stanice.
- Nekanonska mistranslacija toksičnija je od kanonske mistranslacije jer više inhibira rast stanica u normalnim uvjetima i uvjetima toplinskog stresa te uzrokuje veće promjene u ekspresiji proteina.
- Mistranslacija na izoleucinskim pozicijama uzrokuje povećanu ekspresiju glavnih šaperonskih sustava u bakteriji *E. coli*: Hsp70 (DnaK/DnaJ/GrpE), Hsp60/10 (GroES/EL) i Hsp90 (HtpG) te disagregaze ClpB. Uz šaperone, povećana je i ekspresija proteaza HslV/U, Lon i dvije komponente Clp-proteaznog sustava (ClpA i ClpS).
- Mistranslacija na izoleucinskim pozicijama smanjuje ekspresiju proteina koji su uključeni u metaboličke procese i homeostazu željeznih iona.
- Pri nižim razinama mistranslacije, mistranslatirani proteini preferentno su interaktori šaperona DnaK, dok pri višim razinama mistranslacije dolazi do zasićenja šaperonskog sustava.
- Broj DnaK interaktora ne povećava se značajno uslijed mistranslacije.

- Mistranclacija specifično destabilizira proteine koji su uključeni u proces translacije.
- Dugotrajnija izloženost bakterije *E. coli* mistranclaciji na izoleucinskim pozicijama povećava ekspresiju proteina RecA – jednog od glavnih regulatora SOS-odgovora, i RpoS – sigma podjedinice RNA-polimeraze koja potiče ekspresiju gena uključenih u odgovor stanice na stres (engl. *general stress response*).
- Indukcija SOS-odgovora uzrokuje filamentaciju stanica koja nije karakteristična samo za izoleucinsku, nego i leucinsku mistranclaciju i potencijalno predstavlja generalni odgovor na mistranclacijski stres.
- Indukcija SOS-odgovora upućuje na to da mistranclacija ima mutageni učinak.
- Uslijed izloženosti divljeg tipa bakterije *E. coli* rastu u siromašnom mediju s visokom koncentracijom valina ili norvalina, dolazi do nastanka značajne razlike u razini mistranclacije na izoleucinskim pozicijama u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta, potencijalno uzrokovane nepovoljnim omjerom valina i izoleucina u mediju.

## § 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Popis aminokiselina kodiranih genetiĉkim kodom i odgovarajuĉih aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS):

Kratica aminokiseline	Aminokiselina	Kratica aaRS	Aminoacil-tRNA-sintetaza
<b>Ala (A)</b>	alanin	<b>AlaRS</b>	alanil-tRNA-sintetaza
<b>Arg (R)</b>	arginin	<b>ArgRS</b>	arginil-tRNA-sintetaza
<b>Asn (N)</b>	asparagin	<b>AsnRS</b>	asparagil-tRNA-sintetaza
<b>Asp (D)</b>	aspartat	<b>AspRS</b>	aspartil-tRNA-sintetaza
<b>Cys (C)</b>	cistein	<b>CysRS</b>	cisteinil-tRNA-sintetaza
<b>Gln (Q)</b>	glutamin	<b>GlnRS</b>	glutaminil-tRNA-sintetaza
<b>Glu (E)</b>	glutamat	<b>GluRS</b>	glutamil-tRNA-sintetaza
<b>Gly (G)</b>	glicin	<b>GlyRS</b>	glicil-tRNA-sintetaza
<b>His (H)</b>	histidin	<b>HisRS</b>	histidinil-tRNA-sintetaza
<b>Ile (I)</b>	izoleucin	<b>IleRS</b>	izoleucil-tRNA-sintetaza
<b>Leu (L)</b>	leucin	<b>LeuRS</b>	leucil-tRNA-sintetaza
<b>Lys (K)</b>	lizin	<b>LysRS</b>	lizil-tRNA-sintetaza
<b>Met (M)</b>	metionin	<b>MetRS</b>	metionil-tRNA-sintetaza
<b>Phe (F)</b>	fenilalanin	<b>PheRS</b>	fenilalanil-tRNA-sintetaza
<b>Pro (P)</b>	prolin	<b>ProRS</b>	prolil-tRNA-sintetaza
<b>Ser (S)</b>	serin	<b>SerRS</b>	seril-tRNA-sintetaza
<b>Thr (T)</b>	treonin	<b>ThrRS</b>	treonil-tRNA-sintetaza
<b>Trp (W)</b>	triptofan	<b>TrpRS</b>	triptofanil-tRNA-sintetaza
<b>Tyr (Y)</b>	tirozin	<b>TyrRS</b>	tirozil-tRNA-sintetaza
<b>Val (V)</b>	valin	<b>ValRS</b>	valil-tRNA-sintetaza



## Ostale kratice:

Kratica	Pojam
AaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
$\alpha$ -Abu	$\alpha$ -aminobutanoat
Ak	aminokiselina
ALS	amiotrofična lateralna skleroza
AMP	adenozin monofosfat
ATP	adenozin trifosfat
Aze	azetidin-2-karboksilna kiselina
BCAA	engl. <i>branched chain amino acids</i> , aminokiseline s razgranatim bočnim ogrankom
BMAA	$\beta$ -N-metilamino-L-alanin
CFU	engl. <i>colony forming unit</i> , broj zasebnih kolonija
CID	engl. <i>collision induced dissociation</i> , disocijacija inducirana sudarom
CP1	engl. <i>connective peptide 1</i> , spojni peptid 1
DDA	engl. <i>data dependent acquisition</i> , analiza ovisna o MS1 spektru
$\delta$ hI	$\delta$ -hidroksiizoleucin
$\delta$ hL	$\delta$ -hidroksileucin
DIA	engl. <i>data independent acquisition</i> , analiza neovisna o MS1 spektru
DML	engl. <i>dimethyl-labelling</i> , izotopno obilježavanje peptida metilnim skupinama
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EF-Tu	elongacijski faktor Tu
ESI	engl. <i>electrospray ionisation</i> , ionizacija elektrosprejem
ETD	engl. <i>electron transfer dissociation</i> , disocijacija inducirana prijenosom elektrona
FAD	flavin adenin dinukleotid
FDR	engl. <i>false-discovery rate</i> , udio lažno pozitivnih identifikacija

---

<b>FRT</b>	engl. <i>flippase recognition target</i> , mjesto prepoznavanja flipaze (Flp)
<b>γhI</b>	γ-hidroksiizoleucin
<b>γhL</b>	γ-hidroksileucin
<b>GTP</b>	gvanozin trifosfat
<b>Hcy</b>	homocistein
<b>HILIC</b>	engl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija hidrofilnih interakcija
<b>Hse</b>	homoserin
<b>4hP</b>	4-hidroksiprolin
<b>iTRAQ</b>	engl. <i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i> , izobarne oznake za relativnu i apsolutnu kvantifikaciju
<b>LC</b>	engl. <i>liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija
<b>LC-MS/MS</b>	engl. <i>liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometer</i> , tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnim spektrometrom masa
<b>LFQ</b>	engl. <i>label-free quantification</i> , kvantifikacija bez izotopne oznake
<b>MBP</b>	engl. <i>myelin basic protein</i> , mijelinski bazični protein
<b>mRNA</b>	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> , glasnička ribonukleinska kiselina
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>NADP<sup>+</sup></b>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
<b>Ni-NTA</b>	engl. <i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> , nitriltriocтена kiselina u kompleksu s Ni <sup>2+</sup>
<b>nLeu</b>	norleucin
<b>Nva</b>	norvalin
<b>Orn</b>	ornitin
<b>PCR</b>	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimerazom
<b>PEP</b>	engl. <i>posterior error probability</i> , vjerojatnost pogrešne identifikacije

---

<i>pfu</i>	engl. <i>plaque-forming unit</i> , titar faga
<b>PMSF</b>	fenilmetilsulfonil-fluorid
<b>PPi</b>	pirofosfat, $P_2O_7^{4-}$
<b>PSM</b>	engl. <i>peptide-spectrum match</i> , par peptida i eksperimentalnog MS/MS spektra s najboljim poklapanjem
<b>RNA</b>	engl. <i>ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina,
<b>RPC</b>	engl. <i>reverse phase chromatography</i> , kromatografija obrnutih faza
<b>SAX</b>	engl. <i>strong anion exchange chromatography</i> , kromatografija anionske izmjene
<b>SCX</b>	engl. <i>strong cation exchange chromatography</i> , kromatografija kationske izmjene
<b>SDS</b>	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , natrijev dodecilsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	engl. <i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> , elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz uporabu natrijevog dodecilsulfata
<b>SerHO</b>	serin hidroksamat
<b>SILAC</b>	engl. <i>stable isotope labelling with amino acids in cell culture</i> , stabilno izotopno označavanje s aminokiselinama u staničnoj kulturi
<b>TMT</b>	engl. <i>tandem mass tag</i> , tandemna masena oznaka
<b>tRNA</b>	engl. <i>transfer ribonucleic acid</i> , prijenosna ribonukleinska kiselina

## § 8. LITERATURNI IZVORI

- [1] E. Mordret, O. Dahan, O. Asraf, R. Rak, A. Yehonadav, G. D. Barnabas, J. Cox, T. Geiger, A. B. Lindner, Y. Pilpel, *Mol. Cell.* **75** (2019) 427–441.
- [2] K. Mohler, M. Ibba, *Nat. Microbiol.* **2** (2017).
- [3] J. J. Perona, I. Gruić-Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **344** (2014) 1–41.
- [4] I. A. Vasileva, N. A. Moor, *Biochemistry (Moscow)* **72** (2007) 306–324.
- [5] N. Cvetešić, M. Dulic, M. Bilus, N. Sostaric, B. Lenhard, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 8618–8631.
- [6] L. Li, M. T. Boniecki, J. D. Jaffe, B. S. Imai, P. M. Yau, Z. A. Luthey-Schulten, S. A. Martinis, *PNAS* **108** (2011) 9378–9383.
- [7] I. Živković, K. Ivković, N. Cvetešić, A. Marsavelski, I. Gruić-Sovulj, *Nucleic Acids Res.* **50** (2022) 4029–4041.
- [8] M. Bilus, M. Šemanjski, M. Močibob, I. Živković, N. Cvetešić, D. S. Tawfik, A. Toth-Petroczy, B. Maček, I. Gruić-Sovulj, *J. Mol. Biol.* **431** (2019) 1284–129.
- [9] B. D. Bennett, E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J. Van Dien, J. D. Rabinowitz, *Nat. Chem. Biol.* **5** (2009) 593–599.
- [10] J. Soini, C. Falschlehner, C. Liedert, J. Bernhardt, J. Vuoristo, P. Neubar, *Microb. Cell Fact.* **7**:30 (2008).
- [11] N. Cvetešić, M. Šemanjski, B. Soufi, K. Krug, I. Gruic-Sovulj, B. Maček, *Sci. Rep.* **6** (2016).
- [12] K. Fujiwara, H. Toda, M. Ikeguchi, *BMC Struct. Biol.* **12**:18 (2012).
- [13] Z. Škibola, I. Gruić-Sovulj, A. Maršavelski, *J. Mol. Graphics Modell.* **123** (2023).
- [14] R. J. Moreau, C. R. Schubert, K. A. Nasr, M. Török, J. S. Miller, R. J. Kennedy, D. S. Kemp, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009) 13107–13116.
- [15] A. Gershenson, L. M. Gierasch, A. Pastore, S. E. Radford, *Nat. Chem. Biol.* **10** (2014) 884–891.
- [16] B. Ruan, S. Palioura, J. Sabina, L. Marvin-Guy, S. Kochhar, R. A. LaRossa, D. Söll, *PNAS* **105** (2008) 16502–16507.
- [17] G. Calloni, T. Chen, S. M. Schermann, H. Chang, P. Genevoux, F. Agostini, G. G. Tartaglia, M. Hayer-Hartl, F. Ulrich Hartl, *Cell Rep.* **1** (2012) 251–264.
- [18] Y. E. Kim, M. S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, *Annu. Rev. Biochem.* **82** (2013) 323–355.
- [19] C. R. Evans, Y. Fan, J. Ling, *FEBS Lett.* **593** (2019) 3220–3227.
- [20] B. Javid, F. Sorrentino, M. Toosky, W. Zheng, J. T. Pinkham, N. Jain, M. Pan, P. Deighan, E. J. Rubin, *PNAS* **111** (2014) 1132–1137.
- [21] P. Kelly, N. Backes, K. Mohler, C. Buser, A. Kavoor, J. Rinehart, G. Phillips, M. Ibba, *mBio.* **10** (2019).
- [22] A. Kavoor, P. Kelly, M. Ibba, *J. Biol. Chem.* **289** (2022).

- [23] J. M. Bacher, W. F. Waas, D. Metzgar, V. de Crécy-Lagard, P. Schimmel, *J. Bacteriol.* **189** (2007) 6494–6496.
- [24] J. M. Bacher, V. de Crécy-Lagard, P. R. Schimmel, *PNAS* **102** (2005) 1697–1701.
- [25] V. Pezo, D. Metzgar, T. L. Hendrikson, W. F. Waas, S. Hazebrouck, V. Döring, P. Marlière, P. Schimmel, V. de Crécy-Lagard, *PNAS* **101** (2004) 8593–8597.
- [26] H. Zhang, J. Wu, Z. Lyu, J. Ling, *Nucleic Acid Res.* **49** (2021) 9953–9964.
- [27] L. C. Thomason, N. Constantino, D. L. Court, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* (2007) 1.17.1–1.17.8.
- [28] P. P. Cherepanov, W. Wackernagel, *Gene* **158** (1995) 9–14.
- [29] F. Crick, *Nature*. **227** (1970) 561–563.
- [30] H. Lee, E. Popodi, H. Tang, P. L. Foster, *PNAS* **109** (2012) 2774–2783.
- [31] M. Imashimizu, T. Oshima, L. Lubkowska, M. Kashlev, *Nuc. Acid. Res.* **41** (2013) 9090–9104.
- [32] M. V. Rodnina, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **86** (2012) 95–128.
- [33] M. Stanzel, A. Schön, M. Sprinzl, *Eur. J. Biochem.* **219** (1994) 435–439.
- [34] I. Stansfield, K. M. Jones, P. Herbert, A. Lewendon, W. V. Shaw, M. F. Tuite, *J. Mol. Biol.* **282** (1998) 13–24.
- [35] N. Netzer, J. M. Goodenbour, A. David, K. A. Dittmar, R. B. Jones, J. R. Schneider, D. Boone, E. M. Eves, M. R. Rosner, J. S. Gibbs, A. Embry, B. Dolan, S. Das, H. D. Hickman, P. Berglund, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, T. Pan, *Nature* **462** (2009) 522–526.
- [36] J. Lee, D. Kim, B. Kim, W. Yang, J. Hong, T. Kang, Y. Oh, K. Kim, B. Han, B. Hwang, B. Kang, M. Kang, M. Kim, N. Kwon, S. Kim, *J. Cell. Sci.* **127** (2014) 4234–4245.
- [37] G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff, D. Moras, *Nature*. **347** (1990) 203–206.
- [38] I. Hanukoglu, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **43** (2015) 206–209.
- [39] J. Ling, N. Reynolds, M. Ibba, *Annu. Rev. Microbiol.* **63** (2009) 61–78.
- [40] T. Bullwinkle, B. Lazazzera, M. Ibba, *Annu. Rev. Genet.* **48** (2014) 149–166.
- [41] N. Cveticic, J. J. Perona, I. Gruić-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 25 381–25 394.
- [42] O. Nureki, D. G. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T. L. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama, *Science*. **280** (1998) 578–582.
- [43] A. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry*. **15** (1976) 3342–3346.
- [44] F. Hauth, D. Funck, J. S. Hartig, *Nucl. Acid. Res.* **51** (2023) 2001–2010.
- [45] J. Soutorina, P. Plateau, S. Blanquet, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 32 535–32 542.
- [46] K. I. Pawar, K. Suma, A. Seenivasan, S. K. Kuncha, S. B. Routh, S. P. Kruparani, R. Sankaranarayanan, *eLife*. (2017) **6**:e24001.
- [47] I. Ahel, D. Korenčić, M. Ibba, D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 15 422–15 427.
- [48] A. An, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **41** (2004) 42 359–42 362.
- [49] A. B. Kunmishin Nagy, M. Bakhtina, K. Musier-Forsyth, *Enzymes*. **48** (2020) 69–115.
- [50] M. Dulic, N. Cveticic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 23 799–23 809.
- [51] M. Dulić, J. J. Perona, I. Gruić-Sovulj, *Biochemistry*. **53** (2014) 6189–6198.

- [52] L. F. Silvan, J. Wang, T. A. Steitz, *Science*. **285** (1999) 1074–1077.
- [53] R. Muramatsu, T. Negishi, T. Mimoto, A. Miura, S. Misawa, H. Hayashi, *J. Biotechnol.* **14** (2002) 131–142.
- [54] K. Zhang, H. Li, K. M. Cho, J. C. Liao, *PNAS*. **107** (2010) 6234–6239.
- [55] M. Sugiura, M. Kisumi, I. Chibata, *J. Antibiot.* **34** (1981) 1283–1289.
- [56] D. S. Tawfik, I. Gruić-Sovulj, *FEBS J.* **287** (2020) 1284–1305.
- [57] M. Kanehisa, S. Goto, *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 27–30.
- [58] M. Kanehisa, *Protein Sci.* **28** (2019) 1947–1951.
- [59] M. Kanehisa, M. Furumichi, Y. Sato, M. Kawashima, M. Ishiguro-Watanabe, *Nucleic Acids Res.* **51** (2022).
- [60] A. L. Weber, S. L. Miller, *J. Mol. Evol.* **17** (1981) 273–284.
- [61] K. M. Krause, A. W. Serio, T. R. Kane, L. E. Connolly, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **6** (2016).
- [62] E. B. Kramer, P. J. Farabaugh, *RNA* **13** (2007) 87–96.
- [63] T. J. Bullwinkle, N. M. Reynolds, M. Raina, A. Moghal, E. Matsa, A. Rajkovic, H. Kayadibi, F. Fazlollahi, C. Ryan, N. Howitz, K. F. Faull, B. A. Lazazzera, M. Ibba, *eLife*. **3** (2014) e02501.
- [64] P. Srinivas, R. E. Steiner, I. J. Pavelich, R. Guerrero-Ferreira, P. Juneja, M. Ibba, C. M. Dunham, *Nucleic Acids Res.* **49** (2021) 11800–11809.
- [65] L. A. Nangle, C. M. Motta, P. Schimmel, *Chem. Biol.* **13** (2006) 1091–1100.
- [66] Y. Fan, C. R. Evans, J. Ling, *Sci Rep.* **6** (2016).
- [67] J. Woong Lee, K. Beebe, L. A. Nangle, J. Jang, C. M. Longo-Guess, S. A. Cook, M. T. Davisson, J. P. Sundberg, P. Schimmel, S. L. Ackerman, *Nature*. **443** (2006) 50–55.
- [68] D. A. Drummond, C. O. Wilke, *Nat. Rev.* **10** (2009) 715–724.
- [69] M. Stefani, *The Neuroscientist*. **13** (2007) 519–531.
- [70] E. Rubenstein, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67** (2008) 1035–1040.
- [71] E. Rubenstein, u J. Rubenstein, P. Rakic, B. Chen, K. Y. Kwan (ur.), *Neurodevelopmental Disorders*, Academic Press, 2020, str. 27–34.
- [72] R. A. Ridsdale, D. R. Beniac, T. A. Tompkins, M. A. Moscarello, G. Harauz, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 4269–4275.
- [73] N. C. Han, T. J. Bullwinkle, K. F. Loeb, K. F. Faull, K. Mohler, J. Rinehart, M. Ibba, *J. Biol. Chem.* **295** (2020) 1402–1410.
- [74] A. Pataskar, J. Champagne, R. Nagel, J. Kenski, M. Laos, J. Michaux, H. S. Pak, O. B. Bleijerveld, K. Mordente, J. Montenegro Navarro, N. Blommaert, M. M. Nielsen, D. Lovecchio, E. Stone, G. Georgiou, M. C. de Gooijer, O. van Tellingen, M. Altelaar, R. P. Joosten, A. Perrakis, J. Olweus, M. Bassani-Sternberg, D. S. Peeper, R. Agami, *Nature*. **603** (2022) 721–727.
- [75] J. R. Lobry, C. Gautier, *Nucleic Acids Res.* **22** (1994) 3174–3180.
- [76] N. S. Bogatyreva, A. V. Finkelstein, O. Galzitskaya, *J. Bioinf. Comput. Biol.* **4** (2006) 597–608.
- [77] M. N. Vo, M. Terrey, J. W. Lee, B. Roy, J. J. Moresco, L. Sun, H. Fu, Q. Liu, T. G. Weber, J. R. 3rd Yates, K. Fredrick, P. Schimmel, S. L. Ackerman, *Nature*. **557** (2018) 510–515.

- [78] M. Ballesteros, Å. Fredriksson, J. Henriksson, T. Nyström, *EMBO J.* **20** (2001) 5280–5289.
- [79] M. H. Schwartz, T. Pan, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52** (2017) 205–219.
- [80] Y. Fan, J. Wu, M. H. Ung, N. De Lay, C. Cheng, J. Ling, *Nucleic Acids Res.* **43** (2015) 1740–1748.
- [81] M. H. Schwartz, J. R. Waldbauer, L. Zhang, T. Pan, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 10292–10303.
- [82] Y. Sako, N. Nomura, A. Uchida, Y. Ishida, H. Morii, Y. Koga, T. Hoaki, T. Maruyama, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46** (1996) 1070–1077.
- [83] N. C. Gassner, W. A. Baase, B. H. Mooers, R. D. Busam, L. H. Weaver, J. D. Lindstrom, M. L. Quillin, B. W. Matthews, *Biophys. Chem.* **100** (2003) 325–340.
- [84] M. Meyerovich, G. Mamou, S. Ben-Yehuda, *PNAS.* **107** (2010) 11543–11548.
- [85] C. R. Woese, *PNAS.* **54** (1965) 1546–1551.
- [86] Y. Kawaguchi, H. Honda, J. Taniguchi-Morimura, S. Iwasaki, *Nature.* **341** (1989) 164–166.
- [87] A. C. Gomes, I. Miranda, R. M. Silva, G. R. Moura, B. Thomas, A. Akoulitchev, M. A. Santos, *Genome Biol.* **8** (2007) R206.
- [88] M. A. Santos, C. Cheesman, V. Costa, P. Moradas-Ferreira, M. F. Tuite, *Mol. Microbiol.* **31** (1999) 937–947.
- [89] S. Mühlhausen, H. D. Schmitt, U. Plessmann, P. Mienkus, P. Sternisek, T. Perl, M. Weig, H. Urlaub, O. Bader, M. Kollmar, *BMC Biology.* **19** (2021).
- [90] O. Vargas-Rodriguez, A. H. Badran, K. S. Hoffman, M. Chen, A. Crnković, Y. Ding, J. R. Krieger, E. Westhof, Dieter Söll, S. Melnikov, *PNAS.* **118** (2021) e2110797118.
- [91] J. M. Bacher, P. Schimmel, *PNAS.* **104** (2007) 1907–1912.
- [92] H. Su, J. Zhu, H. Li, R. Cai, C. Ealand, X. Wang, Y. Chen, M. U. R. Kayani, T. F. Zhu, D. Moradigaravand, H. Huang, B. D. Kana, B. Javid, *Nat. Microbiol.* **1**(11) (2016).
- [93] E. A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaevev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, S. A. Darst, *Cell.* **104** (2001) 901–912.
- [94] A. Battesti, N. Majdalani, S. Gottesman, *Annu. Rev. Microbiol.* **65** (2011) 189–213.
- [95] H. Weber, T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch, R. Hengge, *J. Bacteriol.* **187** (2005) 1591–1603.
- [96] T. Leng, M. Pan, X. Xu, B. Javid, *Tuberculosis (Edinb).* **95** (2015) 678–681.
- [97] Z. Barak, J. Gallant, D. Lindsley, B. Kwieciszewski, D. Heidel, *J. Mol. Biol.* **263** (1996) 140–148.
- [98] [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) (preuzeto 9. rujna 2023.)
- [99] O. T. Schubert, H. L. Röst, B. C. Collins, G. Rosenberger, R. Aebersold, *Nat. Protoc.* **12** (2017) 1289–1294.
- [100] T. K. Toby, L. Fornelli, N. L. Kelleher, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif).* **12** (2016) 499–519.
- [101] K. Jeong, J. Kim, M. Gaikwad, S. N. Hidayah, L. Heikaus, H. Schlüter, O. Kohlbacher, *Cell Syst.* **10** (2020) 213–218.
- [102] D. P. Donnelly, C. M. Rawlins, C. J. DeHart, L. Fornelli, L. F. Schachner, Z. Lin, J. L. Lippens, K. C. Aluri, R. Sarin, B. Chen, C. Lantz, W. Jung, K. R. Johnson, A. Koller, J.

- J. Wolff, I. D. G. Campuzano, J. R. Auclair, A. R. Ivanov, J. P. Whitelegge, Lj. Paša-Tolić, J. Chamot-Rooke, P. O. Danis, L. M. Smith, Y. O. Tsybin, J. A. Loo, Y. Ge, N. L. Kelleher, J. N. Agar, *Nat. Methods*. **16** (2019) 587–594.
- [103] S. R. Shuken, *J. Proteome Res.* **22** (2023) 2151–2171.
- [104] T. Glatter, C. Ludwig, E. Ahrné, R. Aebersold, A. J. Heck, A. Schmidt, *J. Proteome Res.* **11** (2012) 5145–5156.
- [105] S. Schopper, A. Kahraman, P. Leuenberger, Y. Feng, I. Piazza, O. Müller, P. J. Boersema, P. Picotti, *Nat Protoc.* **12** (2017) 2391–2410.
- [106] P. Liuni, D. J. Wilson, *Expert Rev. Proteomics.* **8** (2011) 197–209.
- [107] B. Kuster, J. Tüshaus, F. P. Bayer, *Nat. Biotechnol.* (2024).
- [108] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham Cooks, *J. Mass Spectrom.* **40** (2005) 430–443.
- [109] <https://pradeepresearch.org/uhrm/> (datum preuzimanja: 18. 9. 2023.)
- [110] J. E. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 9528–9533.
- [111] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **26** (2008) 1367–72.
- [112] S. Tyanova, T. Temu, J. Cox, *Nat. Protoc.* **11** (2016) 2301–2319.
- [113] P. J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A. J. R. Heck, *Nat. Protoc.* **4** (2009) 484–494.
- [114] J. Tavares, F. Assis-Santos, M. A. S. Santos, *J. Proteomics. Bioinform.* **11** (2018) 45–50.
- [115] C. Yu, O. V. Borisov, M. Alvarez, D. A. Michels, Y. J. Wang, V. Ling, *Anal. Chem.* **81** (2009) 9282–9290.
- [116] P. M. Douglas, S. Treusch, H. Y. Ren, R. Halfmann, M. L. Duennwald, S. Lindquist, D. M. Cyr, *PNAS.* **105** (2008) 7206–7211.
- [117] F. U. Hartl, *Nature.* **381** (1996) 571–79.
- [118] C. L. Klaipts, G. G. Jayaraj, F. U. Hartl, *J. Cell. Biol.* **217** (2018) 51–63.
- [119] W. Woth, U. Jakob, *Trends Biochem. Sci.* **42** (2017) 899–913.
- [120] F. Chiappori, I. Merelli, G. Colombo, L. Milanese, G. Morra, *Comput. Biol.* **8** (2012).
- [121] N. Howitz, T. Su, B. A. Lazazzera, *J. Mol. Biol.* **432** (2020) 166716.
- [122] M. A. S. Santos, V. M. Perreau, M. F. Tuite, *EMBO J.* **15** (1996) 5060–5068.
- [123] <https://www.genome.wisc.edu/resources/strains.htm> (datum preuzimanja: 22. rujna 2022.)
- [124] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okomura, M. Baba, K. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.* **2** (2006).
- [125] M. Singer, T. A. Baker, G. Schnitzler, S. M. Deischel, M. Goel, W. Dove, K. J. Jaacks, A. D. Grossman, J. W. Erickson, C. A. Gross, *Microbiol. Rev.* **53** (1989) 1–24.
- [126] B. P. Nichols, O. Shafiq, V. Meiners, *J. Bacteriol.* **180** (1998) 6408–6411.
- [127] M. Pranjić, P. Spät, M. Šemanjski Čurković, B. Maček, I. Gruić-Sovulj, M. Močibob, *Int. J. Biol. Macromol.* **262** (2024) 130068.
- [128] <https://cgsc.biology.yale.edu/Site.php?ID=64621> (datum preuzimanja: 26. rujna 2022.)
- [129] K. A. Datsenko, B. L. Wanner, *PNAS.* **97** (2000) 6640–6645.



- [130] D. Wessel, U. I. Flügge, *Anal. Biochem.* **138** (1984) 141-143..
- [131] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1896–906.
- [132] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, M. Mann, *J. Proteome Res.* **10** (2011) 1794–1805.
- [133] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M. Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox, *Nature Methods.* **13** (2016) 731–740.
- [134] C. Lazar, L. Gatto, M. Ferro, C. Bruley, T. Burger, *J. Proteome Res.* **15** (2016) 1116–1125.
- [135] A. Garcia-Moreno, R. López-Domínguez, J. A. Villatoro-García, A. Ramirez-Mena, E. Aparicio-Puerta, M. Hackenberg, A. Pascual-Montano, P. Carmona-Saez, *Biomedicines.* **10** (2022) 590.
- [136] J. Droste, V. Ortseifen, L. Schaffert, M. Persicke, S. Schneiker-Bekel, A. Pühler, J. Kalinowski, *BMC Genomics.* **21** (2020) 818.
- [137] S. Handtke, D. Albrecht, A. Otto, D. Becher, M. Hecker, B. Voigt, *Proteomics.* **18** (2018).
- [138] V. Ravikumar, N. C. Nalpas, V. Anselm, K. Krug, M. Lenuzzi, M. S. Šestak, T. Domazet-Lošo, I. Mijakovic, B. Maček, *Sci Rep.* **8** (2018).
- [139] J. Yang, M. Liu, J. Liu, B. Liu, C. He, Z. Chen, *Front. Microbiol.* **11** (2020) 598797.
- [140] F. Greiner-Haas, M. V. Bergen, G. Sawers, U. Lechner, D. Türkowsky, *Microorganisms.* **9** (2021) 365.
- [141] M. Cerletti, M. I. Giménez, C. Tröetschel, C. D' Alessandro, A. Poetsch, R. E. De Castro, R. A. Paggi, *Proteomics.* **18** (2018 ) e18001..
- [142] I. Zubov Aleksandr, A. Semashko Tatiana, V. Evsyutina Daria, G. Ladygina Valentina, I. Kovalchuk Sergey, H. Ziganshin Rustam, A. Galyamina Maria, Y. Fisunov Gleb, V. Pobeguts Olga, *Data Brief.* **31** (2020) 105853.
- [143] F. A. Herbst, H. N. Danielsen, R. Wimmer, P. H. Nielsen, M. S. Dueholm, *Proteomics.* **15** (2015) 3244–3252.
- [144] E. A. Zalis, A. S. Nuxoll, S. Manuse, G. Clair, L. C. Radlinski, B. P. Conlon, J. Adkins, K. Lewis, *mBio.* **10** (2019) e01930-19.
- [145] J. H. Nickling, T. Baumann, F. J. Schmitt, M. Bartholomae, O. P. Kuipers, T. Friedrich, N. Budisa, *J. Vis. Exp.* **135** (2018) e57551.
- [146] R. A. Jensen, D. H. Calhoun, R. Twarog, *Crit. Rev. Microbiol.* **8** (1981) 229–266.
- [147] R. I. Leavitt, H. E. Umbarger, *J. Bacteriol.* **83** (1962) 624–630.
- [148] M. Biluš, Mehanizam diskriminacije prirodnih proteinogenih i neproteinogenih nepripadnih aminokiselina kod aminoacil-tRNA-sintetaza razreda IA, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016., str. 96–97.
- [149] Y. Miyanoiri, Y. Ishida, M. Takeda, T. Terauchi, M. Inouye, M. Kainosho, *J. Biomol. NMR.* **65** (2016) 109–119.
- [150] M. D. Adams, L. M. Wagner, T. J. Graddis, R. Landick, T. K. Antonucci, A. L. Gibson, D. L. Oxender, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 11 436–11 443.
- [151] M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, K. van 't Riet, *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (1990) 1875–1881.

- [152] S. S. Justice, D. A. Hunstad, L. Cegels, S. J. Hultgren, *Nat. Rev. Microbiol.* **6** (2008) 162–168.
- [153] D. Christ, J. W. Chin, *Protein Eng., Des. Sel.* **21** (2008) 121–125.
- [154] A. Brkić, Utjecaj mistranslacije na stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019., str. 65.
- [155] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Lubner, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, *Mol Cell Proteomics.* **13** (2014) 2513–2526.
- [156] T. Haslberger, B. Bukau, A. Mogk, *Biochem. Cell. Biol.* **88** (2010) 63–75.
- [157] S. A. Mahmoud, P. Chien, *Annu. Rev. Biochem.* **87** (2018) 677–696.
- [158] I. V. Sudakin, u E. A. Golemnis i P. D. Adams (ur.), *Protein-Protein Interactions, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005, str. 40–42.
- [159] K. H. Masłowska, K. Makiela-Dzbenka, I. J. Fijalkowska, *Environ. Mol. Mutagen.* **60** (2019) 368–384.
- [160] J. Jin, K. Choi, U. Jung, Y. In, S. Lee, J. Lee, *Enzyme Microb. Technol.* **35** (2004) 694–706.
- [161] S. A. Haney, J. V. Platko, D. L. Oxender, J. M. Calvo, *J. Bacteriol.* **174** (1992) 108–115.
- [162] I. Živković, J. Moschner, B. Koksich, I. Gruić-Sovulj, *FEBS J.* **287** (2020) 800–813.
- [163] M. Rahmanian, D. R. Claus, D. L. Oxender, *J. Bacteriol.* **116** (1973) 1258–1266.
- [164] <https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG10540#TU> (datum preuzimanja 10.1.2024.)
- [165] <https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG10539#TU> (datum preuzimanja 10.1.2024.)
- [166] J. M. Calvo, R. G. Matthews, *Microbiol. Rev.* **58** (1994) 466–490.
- [167] P. Leuenberger, S. Gansch, A. Kahraman, V. Cappelletti, P. J. Boersema, C. von Mering, M. Claassen, P. Picotti, *Science.* **355** (2017).
- [168] M. Guo, Y. E. Chong, R. Shapiro, K. Beebe, X. Yang, P. Schimmel, *Nature.* **462** (2009) 808–212.
- [169] L. P. Kozłowski, *Nucleic Acids Res.* **45** (2017) D1112–D1116.
- [170] J. Ling, D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010) 4028–4033.
- [171] M. Caballero-Molada, M. D. Planes, H. Benlloch, S. Ates, M. A. Naranjo, R. Serrano, *Biochem J.* **475** (2018) 1523–1534.
- [172] S. P. Acebrón, I. Martín, U. del Castillo, F. Moro, A. Muga, *FEBS Lett.* **583** (2009) 2991–2996.
- [173] T. H. Jones, K. M. Vail, L. M. McMullen, *Int. J. Food Microbiol.* **165** (2013) 97–110.
- [174] M. G. Rizzo, L. M. De Plano, D. Franco, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104** (2020) 4631–4642.



## § 9. DODATAK

**Dodatna tablica 1.** Ile → Nva mistranslacija uzrokuje diferencijalnu ekspresiju 233 proteina. Tablica prikazuje listu proteina čija je ekspresija povećana ili utišana. Protein je definiran kao diferencijalno ekspimiran ukoliko zadovoljava dva uvjeta: i) razlika između logaritma LFQ intenziteta za dani protein u mistranslatiranom (u M9\* mediju s Nva) i kontrolnom (u M9\* mediju) uzorku je signifikantno različita od nule kako je pokazano *t*-testom uz primjenu postupka Benjamini-Hochberg (FDR = 5 %) i ii) razina ekspresije proteina je dvostruko veća u jednom od spomenuta dva uspoređivana uzorka.

Diferencijalna ekspresija	Ime proteina	Broj diferencijalno ekspimiranih proteina
Povišena ekspresija proteina	AceB, AlsB, ArtI, ArtM, BetB, BetT, BioA, BioB, BioD1, BioF, Cdd, ClpA, ClpB, ClpS, CpxP, CysA, CysH, CysP, DadA, DadX, DnaJ, DnaK, Eco, FxsA, GcvT, GltP, Gnd, GnsB, GntT, GroL, GroS, GrpE, HisB, HisC, HisD, HisF, HisG, HisH, HisI, HisJ, Hmp, HslJ, HslO, HslU, HslV, HtpG, IbpA, IhfA, IlvB, IlvG, IlvN, Kbl, LdhA, LipA, Lon, LysU, MetA, MetB, MetC, MetF, MetI, MetJ, MetK, MetL, MetN, MetQ, MetR, MgtA, MmuM, MmuP, MoaB, MsrB, MutM, NrdD, OmpC, OmpF, OmpX, OppA, OppB, OppC, OppD, OppF, OsmY, PanM, PflA, PliG, RaiA, RbsA, RbsB, RbsD, RpsO, Sbp, SdaA, SdaC, SlyB, Sra, Tdh, TreC, YbbN, YbdH, YbdL, YbeD, YbfA, YbgS, YciN, YcjF, YcjX, YdcH, YdeI, YdhR, YfaY, YfcE, YiaG, YjbJ, YmgD, YmgG, YqhD, ZapB, ZntA	119
Utišana ekspresija proteina	Aas, AidB, AlaA, AldA, AppA, AroF, AscG, AstC, AvtA, BcsG, BirA, Cfa, CirA, CusA, CusB, DapB, Dcm, DcuR, EfeB, EntA, EntB, EntC, EntE, EntF, Epd, EpmB, EvgA, EvgS, FecA, FecR, FepA, FepC, Fes, FhuF, FimC, Fiu, FrlR, GadA, GadB, GadC, GadE, GatD, GatZ, Gcd, GdhA, Ggt, Glf, GlgC, GlgP, GlgX, GlsA1, GltB, GltD, HdeB, HdeD, HsdS, IclR, IlvH, IlvI, KatE, KefC, LamB, LeuC, LeuD, LivF, LivG, LivJ, LivK, LysC, MalE, MalM, MalQ, MdtE, MdtF, NrdE, NrdF, PlaP, PntA, PntB, PotG, Prr, PtrB, PuuC, PuuE, RbbA, RclA, RfaJ, RfbC, RimO, RsmF, RstA, ShiA, Slp, SpeC, StpA, SufB, SufD, Tag, TopB, TreF, UcpA, UgpC, YbdZ, YbiO, YbiU, YbiX, YbjX, YcgB, YciW, YdcI, YdcP, YeiE, YejF, YfdH	114

**Dodatna tablica 2.** Ile → Val mistranslacija uzrokuje diferencijalnu ekspresiju 158 proteina. Tablica prikazuje listu proteina čija je ekspresija povećana i utišana. Protein je definiran kao diferencijalno ekspimiran ukoliko zadovoljava dva uvjeta: i) razlika između logaritma LFQ intenziteta za dani protein u mistranslatiranom (u M9\* mediju s Val) i kontrolnom (u M9\* mediju) uzorku je signifikantno različita od nule kako je pokazano *t*-testom uz primjenu postupka Benjamini-Hochberg (FDR = 5 %) i ii) razina ekspresije proteina je dvostruko veća u jednom od spomenuta dva uspoređivana uzorka.

Diferencijalna ekspresija	Ime proteina	Broj diferencijalno ekspimiranih proteina
Povišena ekspresija proteina	BetB, BetT, BioB, BioD1, ClpA, ClpB, ClpS, CpxP, Crr, CysA, CysH, CysP, DadA, DedA, DnaJ, DnaK, Eco, FadE, FldA, FxsA, GltP, GntT, GroL, GroS, GrpE, HiuH, HslJ, HslO, HslU, HslV, HtpG, IbpA, IhfA, LdhA, Lon, MutM, NrdD, OmpX, PflA, ProX, RaiA, RlmE, Sbp, SodC, Sra, TreC, YbbN, YbeD, YbeZ, YbfA, YciG, YcjF, YcjX, YdeI, YeaJ, YebF, YebG, YedY, YegR, YfdX, YiaG, YidQ, YjbJ, YjiY, YmgD, YmgG, YqjK, ZntA	68
Utišana ekspresija proteina	AlaA, AldA, AmyA, ArgA, AroF, AscG, BcsE, Cfa, CirA, CobT, CsgD, CusA, DosC, EfeB, EntA, EntB, EntC, EntE, EntF, Epd, EpmB, EvgA, ExoX, FadR, FepA, FepC, Fes, FhuC, FhuE, FhuF, Fiu, GadA, GadB, GadC, GadE, GatA, GatD, GatY, GatZ, Ggt, Glf, GlgC, GlgP, GlgX, GlnP, GlsA1, HdeB, HdeD, HexR, IclR, LamB, LivJ, MalE, MalM, MalP, MalQ, McrB, MdtE, MdtF, MetE, MetH, Mrr, NrdE, PlsX, PqqL, Prr, PuuB, PuuC, PuuE, PuuR, RfaJ, RfbC, RimO, RstA, Slp, ThyA, TopB, TreF, UraA, WbbJ, YbdZ, YbiX, YbjX, YcjW, YdcI, YeaH, YebV, YeiE, YfdH, YlaC	90

**Dodatna tablica 3.** Interaktori DnaK izolirani nakon 2 h rasta pri 42 °C. Sojevi ED<sup>-</sup> and ED<sup>-</sup> dnaK\_His su uzgojeni u M9\* mediju bez (kontrola) ili s 1 mmol/L valinom (Val) najprije pri 37 °C, a zatim pri 42 °C 2 h do OD<sub>600</sub> ~ 0,6. Izolirani stanični ekstrakti iskorišteni su za izolaciju na Ni-NTA koloni. Eluat staničnog ekstrakta ED<sup>-</sup> dnaK\_His sadrži specifične i nespecifične interaktore (skr. SI + NI), a eluat staničnog ekstrakta ED<sup>-</sup> samo nespecifične interaktore (skr. NI). Peptidi iz uzorka SI+NI označe se teškom (<sup>-13</sup>CD<sub>3</sub>), a peptidi iz uzorka NI lakom (-CH<sub>3</sub>) metilnom skupinom. Različito izotopno označeni uzorci peptida SI+NI i NI pomiješaju se u masenom omjeru 1:1 i analiziraju LC-MS/MS. Proteini čiji je omjer intenziteta u uzorku NI+SI 4 puta veći nego u NI u dvije od tri replike ili koji su identificirani samo u NI+SI uzorku u 2 od 3 replike određeni su kao interaktori DnaK.

Uvjet rasta	Interaktori DnaK
kontrola	AccB, AccD, AceA, Add, AdhE, Adk, AhpC, ArgB, ArgD, ArgF, ArgG, ArgI, Asd, AsnA, AsnB, AtpA, BamC, BioB, Cfa, ClpA, ClpB, ClpP, ClpX, CmoA, CpxP, Crr, CsrA, CysD, CysK, CysN, DnaJ, DnaK, Eno, EntC, Era, ErpA, Ffh, FimA, FlgM, FrmA, FtsK, FtsY, FtsZ, GadA, GadB, GatB, GlyA, Gnd, GrcA, GroL, GrpE, GuaB, GyrB, HemL, HisA, HisG, HldE, HolE, HscA, HslU, HtpG, IbpA, IlvB, InfB, IscR, IscU, KatE, LepA, Lpp, LuxS, MaeB, ManX, MazE, MenF, MetF, MetH, MetK, MetL, MinC, MinD, MinE, MreB, MukE, MutL, NarL, NarP, NlpA, NlpD, NrdR, NsrR, NuoB, NuoC, NuoF, OmpA, OmpR, OppF, OsmY, PdxK, PflB, Pnp, ProB, PtsI, PurC, PurR, PurT, PykF, PyrG, PyrI, QueF, RadA, RbfA, RecA, RhlB, Rho, RibD, RimO, RodZ, RplF, RplY, RpmE, RpmG, RpoA, RpoB, RpoS, RpoZ, RpsA, RpsE, SelD, SodC, Spy, TatE, ThiG, ThrA, TolC, TrpB, TsaD, TufA/TufB, TypA, UspE, UvrY, YbeD, YceD, YceF, YcgL, YchF, YciH, YebF, YedF, YejL, YgfZ, YhbO, YhhA, YibT, YjjU, YkgO, YnhG, YqiC, YrfG, ZapA
Val	AccB, AccC, AceA, AceF, Add, AdhE, AhpC, AlaS, ArcA, ArgB, ArgD, ArgG, ArgI, Asd, AsnA, AspS, AtpA, BamC, CarB, ClpA, ClpB, ClpP, ClpX, Cmk, CmoA, CpxP, Crr, CsgA, CsrA, CysD, CysK, CysN, DinJ, DksA, DnaK, Dps, EcnB, Eno, Era, FabI, Ffh, FtsK, FtsY, FtsZ, FusA, GadA, GadB, GalU, GlyA, GrcA, GroL, GroS, GrpE, GuaB, GyrA, GyrB, HemL, HflK, HisG, HldE, Hns, HolE, Hpt, HscA, HslU, HtpG, HupA, IlvA, IlvB, IlvH, InfB, IscU, KatE, LepA, LexA, Lon, LpdA, LpoB, LptA, LuxS, LysS, ManX, MenF, MetE, MetF, MetK, MetL, MinC, MinD, MoaC, MreB, MukE, MurC, NarL, NrdA, OmpA, OmpR, OmpT, OsmY, Pal, PdxK, PflB, Pgg, Pnp, PpsA, ProB, PtsI, PurB, PurC, PurL, PurR, PurT, PutA, PykF, PyrI, RbfA, RecA, RhlB, Rho, RlpA, RpiA, RplE, RplF, RplJ, RplR, RplY, RpmG, RpoA, RpoB, RpoD, RpoS, RpoZ, RpsA, RpsE, SelB, SelD, SodA, SodC, Spy, Sra, SthA, SucB, SucC, TalA, ThrA, TrpS, TsaD, TufA/TufB, TypA, Udk, Upp, Usg, UspF, UvrY, WbbK, YahO, YbeD, YbgF, YbiJ, YceD, YdeI, YdgA, YdgH, YeaG, YebF, YecC, YeeD, YejL, YfcE, YghA, YhbO, YheO, YhhA, YibT, YihD, YihI, YjgR, YnhG, YqiC

## § 10. ŽIVOTOPIS

Marija Pranjić završila je preddiplomski i diplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s diplomskim radom *Drevni proteini kao termički stabilniji analozi postojećih proteina* pod mentorstvom doc. dr. sc. Marka Močiboba. Od studenog 2017. zaposlena je kao asistentica na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Sudjeluje izvođenju seminarske i praktikumske nastave iz različitih biokemijskih kolegija za studente kemije i molekularne biologije, autorica je *youtube* kanala Biokemija 1 s edukativnim materijalima iz područja biokemije. Neposredna je voditeljica jednog rada nagrađenog Nagradom Kemijskog odsjeka za znanstveno-istraživački rad studenata. Doktorski studij kemije, smjer biokemija, upisuje u akademskoj godini 2018./19. Znanstveno se usavršava tijekom tri mjeseca u laboratoriju prof. Borisa Mačeka na Sveučilištu u Tübingenu (Njemačka) u području kvantitativne spektrometrije masa. Sudjeluje u organizaciji skupa posvećenog spektrometriji masa pod nazivom *1<sup>st</sup> Workshop on Mass Spectrometry in Life Sciences* u Zagrebu, 2022.

### Znanstvene publikacije:

1. **M. Pranjić**, P. Spät, M. Šemanjski Čurković, B. Maček, I. Gruić-Sovulj, M. Močibob, *Int. J. Biol. Macromol.* **262** (2024) 130068.
2. F. Matovinović, R. Novak, S. Hrkač, G. Salai, M. Močibob, **M. Pranjić**, A. Košec, V. Bedeković, L. Grgurević, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **149** (2023) 17 405-17 417.

### Zbornici sažetaka s konferencije:

1. *Book of Abstracts of the 1<sup>st</sup> Workshop on Mass Spectrometry in Life Sciences*, Novak, Ruđer; Dulić, Morana; Horvatić, Anita, Močibob, Marko; **Pranjić, Marija** (ur.) Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2022.

### Sudjelovanja na konferencijama:

1. **Pranjić, Marija**; Gruić-Sovulj, Ita; Močibob, Marko, *Isoleucine mistranslation in stationary phase induces SOS-response and filamentation, 15<sup>th</sup> Mass Spectrometry School in Biotechnology and Medicine*, Dubrovnik, Hrvatska, 2023. (postersko priopćenje)

2. **Pranjić, Marija**, *Data Processing with MaxQuant*, Zagreb, Hrvatska, 2022. (pozvano predavanje)
3. Močibob, Marko; **Pranjić, Marija**; Šemanjski Čurković, Maja; Spät, Philipp; Maček, Boris; Gruić-Sovulj, Ita, *Proteome response to mistranslation, 1<sup>st</sup> Workshop on Mass Spectrometry in Life Sciences*, Zagreb, Hrvatska, 2022. (postersko priopćenje)
4. **Pranjić, Marija**; Močibob, Marko; Šemanjski, Maja; Spät, Phillip; Maček, Boris; Gruić-Sovulj, Ita, *Mistranslation Upregulates Chaperone Production and Impairs Metabolism and Growth*, HDBMB22 *From Science to Knowledge*, Brela, Hrvatska, 2022. (postersko priopćenje)
5. **Pranjić, Marija**; Močibob, Marko; Šemanjski, Maja; Spät, Phillip; Maček, Boris; Gruić-Sovulj, Ita, Utjecaj kanonske i nekanonske mistranslacije na proteostazu stanice, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska, 2020. (postersko priopćenje)
6. **Pranjić, Marija**; Močibob, Marko; Šemanjski, Maja; Maček, Boris; Gruić Sovulj, Ita, *Cellular responses to proteome-wide isoleucine mistranslation, EMBO Practical Course, Quantitative Proteomics: Strategies and Tools to Probe Biology*, Heidelberg, Njemačka, 2019. (postersko priopćenje)
7. **Pranjić, Marija**; Močibob, Marko; Šemanjski, Maja; Maček, Boris; Gruić Sovulj, Ita, *Cellular responses to proteome-wide isoleucine mistranslation, Molecular Biophysics: ABC of the puzzle of Life*, Zagreb, Hrvatska, 2019. (postersko priopćenje)