

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Kian Bigović Villi

**Duplikacije gena za
aminoacil-tRNA-sintetaze i njihove raznolike
uloge u bakterijama**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Kian Bigović Villi

**Aminoacyl-tRNA-synthetase gene duplications
and their diverse roles in bacteria**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa preddiplomskog studija molekularne biologije na Zavodu za Biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Duplikacije gena za aminoacil-tRNA-sintetaze i njihove raznolike uloge u bakterijama

Kian Bigović Villi

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su skupina enzima koja služi u prevođenju informacije zapisane u nukleinskim kiselinama u informaciju zapisanu u polipeptidnim lancima. Njihova kanonska uloga u bakterijskoj stanici obuhvaća stvaranje aminoacil-tRNA, sparivanjem aminokiseline i pripadne molekule tRNA s visokim stupnjem točnosti. Tako nastala aminoacil-tRNA ribosomima služi kao supstrat za sintezu proteina u procesu translacije. Uslijed mnoštva genskih duplikacija i horizontalnih prijenosa gena, neke bakterije stekle su do dva dodatna gena koja kodiraju određenu aaRS. Iako naizgled suvišne, dodatne aaRS pokazale su mnoštvo različitih nekanonskih funkcija koje danim bakterijama donose kompetitivnu prednost. Kako su aaRS zbog svoje esencijalne kanonske uloge često meta antibiotika, mnoge bakterije stekle su dodatnu aaRS otpornu na djelovanje danih antibiotika, induciranu njihovom prisutnošću. Takve aaRS nerijetko se nalaze u okviru genskih klastera za biosintezu pripadnih antibiotika, te bakteriju štite proizvedenog antibiotika, a nerijetko imaju ulogu i u samom biosintetskom procesu. Neke dodatne aaRS su pak postale dio regulatornih sustava procesa sporulacije, dok su druge postale dio bakterijskih odgovora na povišenu temperaturu, niski pH i prisustvo D-aminokiselina. Daljnje proučavanje duplikacija gena za aaRS je od izrazite važnosti jer nosi potencijal za otkriće novih antibiotika i mehanizama otpornosti na njih, ali i saznanja o temeljnim bakterijskim procesima.

Ključne riječi: antibiotska rezistencija, odgovor na stres, sekundarni metaboliti, biosintetski klasteri, *Streptomyces*

(35 stranica, 5 slika, 0 tablica, 105 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Aminoacyl-tRNA-synthetase gene duplications and their diverse roles in bacteria

Kian Bigović Villi

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Aminoacyl-tRNA-synthetases (aaRS) are enzymes that translate the information written in nucleic acids to the information contained in polypeptide chains. Canonically, they catalyse the synthesis of aminoacyl-tRNA, accurately pairing amino acids with the corresponding tRNA molecules. Obtained aminoacyl-tRNAs are central to the process of translation as substrates in the ribosome-mediated protein synthesis. Resulting from numerous gene duplications and horizontal transfers, some bacteria have acquired up to 2 additional genes coding for a particular aaRS. Although seemingly redundant, these additional aaRSs have shown a multitude of different non-canonical functions that confer various competitive advantages. As aaRS are often targets of antibiotic activity, many bacteria have acquired additional, antibiotic-resistant aaRSs induced in their presence. Such aaRSs are usually found within biosynthetic gene clusters for the corresponding antibiotics where they serve to protect the bacteria from the produced antibiotic, while few even have a role in the biosynthetic process. Some additional aaRSs have become parts of a regulatory network governing bacterial sporulation, while others integrated in bacterial responses to elevated temperature, low pH and D-amino acids. Further studies of additional aaRSs are of particular importance, as they may lead to the discovery of new antibiotics and antibiotic resistance mechanisms and elucidate fundamental bacterial processes.

Keywords: antibiotic resistance, stress response, secondary metabolite, biosynthetic cluster, *Streptomyces*

(35 pages, 5 figures, 0 tables, 105 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Ita Gruić Sovulj, Ph.D.

KORIŠTENE KRATICE

aa	aminokiselina
aa-AMP	aminoacil-adenilat
aa-tRNA ^{aa}	aminoacilirana molekula tRNA
AMP	adenozin-5'-monofosfat
Ap3A	5',5'''-diadenozin-trifosfat
Ap4A	5',5'''-diadenozin-tetrafosfat
AsnRS	asparagil-tRNA-sintetaza
ATP	adenozin-5'-trifosfat
HisRS	histidil-tRNA-sintetaza
IleRS	izoleucil-tRNA-sintetaza
K_i	konstanta inhibicije
K_m	Michaelisova konstanta
LeuRS	leucil-tRNA-sintetaza
LysRS	lizil-tRNA-sintetaza
MetRS	metionil-tRNA-sintetaza
PP _i	anorganski pirofosfat
SerRS	seril-tRNA-sintetaza
ThrRS	treonil-tRNA-sintetaza
tRNA	engl. transfer RNA, prijenosna RNA
TrpRS	triptofanil-tRNA-sintetaza
TyrRS	tirozil-tRNA-sintetaza
ValRS	valil-tRNA-sintetaza

SADRŽAJ

1	Uvod.....	1
2	Kanonska uloga aminoacil-tRNA-sintetaza u prijenosu genetičke informacije.....	3
3	Aminoacil-tRNA-sintetaze kao mehanizam obrane od antibiotika	6
3.1	Triptofanil-tRNA-sintetaza otporne na djelovanje indolmicina i chuangxinmicina.....	6
3.2	Metionil-tRNA-sintetaza otporne na djelovanje sintetskih inhibitora	9
3.3	Seril-tRNA-sintetaze odgovorne za sintezu i zaštitu od albomicina	10
3.4	Izoleucil-tRNA-sintetaza otporna na djelovanje mupirocina.....	11
3.5	Ostale aminoacil-tRNA-sintetaze u zaštiti stanice od sekundarnih metabolita.....	12
4	Aminoacil-tRNA-sintetaze u sklopu biosinteze sekundarnih metabolita.....	14
5	Aminoacil-tRNA-sintetaze u zaštiti stanica od D-aminokiselina	16
6	Aminoacil-tRNA-sintetaze implicirane u sporulaciji	18
7	Lizil-tRNA-sintetaza u stresnoj signalizaciji bakterije <i>E. coli</i>	20
8	Zaključak	24
9	Literatura.....	25

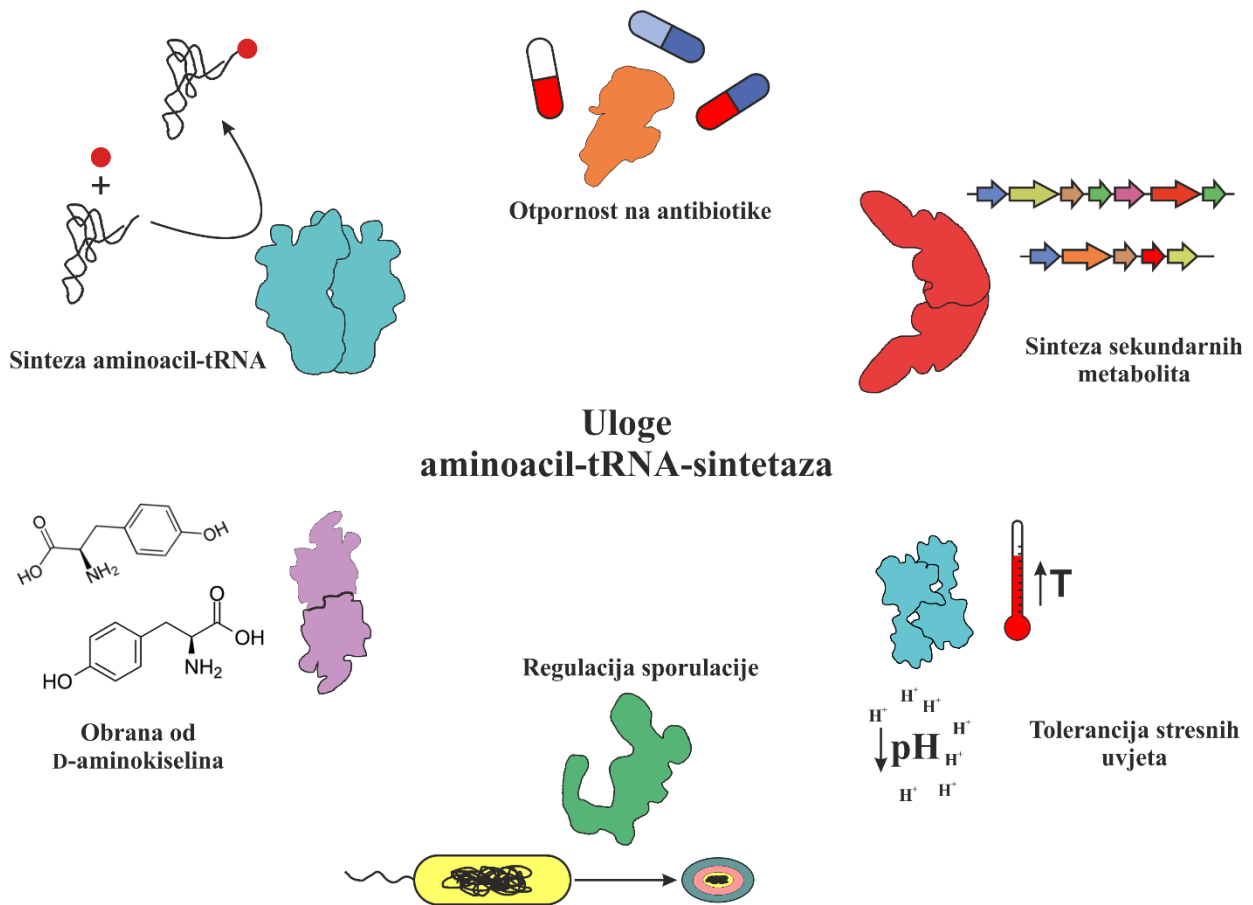
1 Uvod

Genske duplikacije smatraju se jednom od vodećih evolucijskih sila u nastanku novih gena (Conant & Wolfe, 2008; Long i sur., 2013). Postojanje dvije kopije nekog gena omogućava nakupljane mutacija i funkcionalnu divergenciju jedne kopije, ali i očuvanje kanonske uloge gena pomoću druge kopije. Iako divergencija novonastale kopije često završava nastankom nefunkcionalnog pseudo gena, uslijed kombinacije genskog otklona i odgovarajućih selektivnih pritisaka moguća je pojava nove funkcije (Conant & Wolfe, 2008). Nadalje, osim promijene njegove funkcije, mutacijama unutar regulatornih regija moguće je novonastalu kopiju uključiti u već postojeće stanične sustave (Long i sur., 2013).

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) jedni su od ključnih enzima potrebnih za pravilan protok genetičke informacije iz nukleinskih kiselina u proteine. Njihova evolucijska povijest isprepletena je nizom raznih duplikacija i horizontalnih prijenosa, nerijetko između različitih domena živoga svijeta (Andam & Gogarten, 2011; Woese i sur., 2000; Wolf i sur., 1999). Ipak, ovaj rad će se primarno baviti duplikacijama, te dodatnim aaRS koje su organizmi stekli putem raznih horizontalnih prijenosa, nakon pojave pojedinih obitelji aaRS. Usprkos nekada uvriježenom mišljenju da unutar svakog organizma postoji po samo jedan gen za svaku aaRS, danas se zna da postoji niz različitih bakterija iz svih značajnih taksonomskih skupina koje posjeduju 2 ili čak 3 različita gena za jednu aaRS (Vecchione & Sello, 2008).

Otkriće da postoje dodatni, naizgled redundantni geni za aaRS u bakterijama zaintrigiralo je znanstvenike i rezultiralo brojnim istraživanjima njihovih, do tada nepoznatih funkcija. U zadnjih 40 godina od otkrića da u bakteriji *Escherichia coli* postoje dva različita gena za lizil-tRNA-sintetazu (LysRS), otkrivene su bakterije koje posjeduju dva ili više gena za: asparagil-tRNA-sintetazu (AsnRS)(Y. Travin i sur., 2021), aspartil-tRNA-sintetazu (AspRS)(Metlitskaya i sur., 2006), glutamil-tRNA-sintetazu (GluRS)(Chang & Hendrickson, 2009), histidil-tRNA-sintetazu (HisRS)(Diaz i sur., 2020; Renault i sur., 1995), izoleucil-tRNA-sintetazu (IleRS)(Yanagisawa & Kawakami, 2003), leucil-tRNA-sintetazu (LeuRS)(Reader i sur., 2005), LysRS (Clark & Neidhardt, 1990; Cochrane i sur., 2016), metionil-tRNA-sintetazu (MetRS)(Gentry i sur., 2003), seril-tRNA-sintetazu (SerRS)(Zeng i sur., 2009), treonil-tRNA-sintetazu (ThrRS)(Olano i sur., 2004; Putzer i sur., 1990), triptofanil-tRNA-sintetazu (TrpRS)(Kitabatake i sur., 2002), tirozil-tRNA-sintetazu (TyrRS)(Glaser i sur., 1991; Linares i sur., 2012) i valil-tRNA-sintetazu (ValRS)(Ohyama i sur., 1977). U takvim bakterijama jedna aaRS služi za održavanje kanonske uloge u prijenosu genetičke informacije (dalje u radu zvana glavna stanična aaRS), dok preostale aaRS u pravilu poprimaju specijalizirane uloge koje bakteriji donose selektivnu prednost. Nakon opisa kanonske uloge aaRS u stanicama, rad će se prvo dotaknuti iz ljudske perspektive najrelevantnije specijalizirane uloge, opisujući aaRS koje bakterijama pružaju otpornost na razne antibiotike. Zatim slijedi pregled aaRS koje

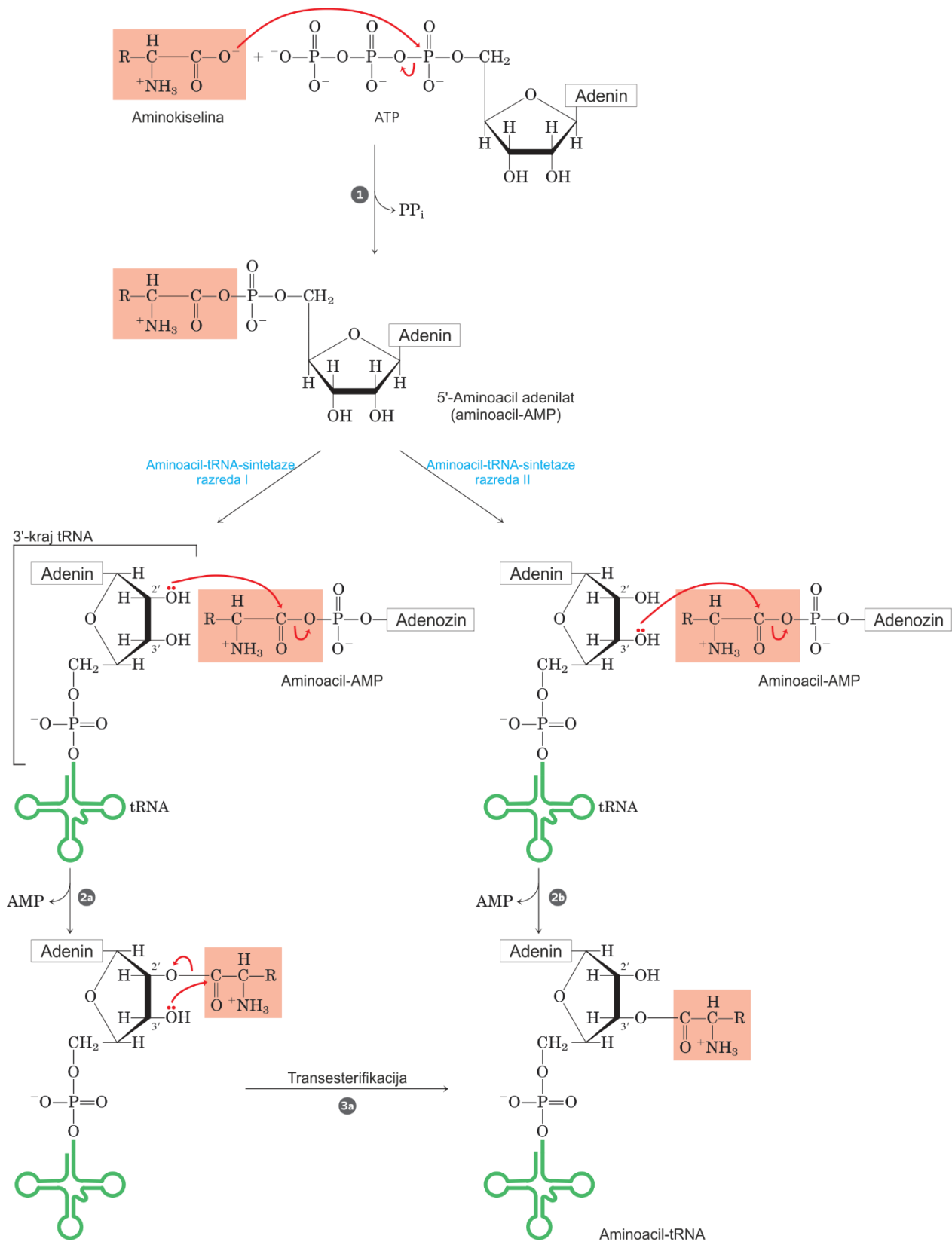
sudjeluju u biosintetskim putevima sekundarnih metabolita, koji nerijetko i sami djeluju kao antibiotici. Potom slijedi pregled i dodatne TyrRS koja bakteriju *B. subtilis* štiti od ugradnje D-tirozina, te ThrRS i ValRS s možebitnom ulogom u sporulaciji. Razrada teme završava s temeljitom analizom stresne LysRS iz bakterije *E. coli*, te aaRS koje skupa sa sustavima za sintezu bioamina sudjeluju u staničnom odgovoru na niski pH. Završno, rad će ponuditi zaključke o uočenim pojavama, te ukazati na još ključna, još uvijek neodgovorena pitanja vezana uz tematiku duplikacija aaRS.



Slika 1 Shematski prikaz uloga aminoacil-tRNA-sintetaza u bakterijama.

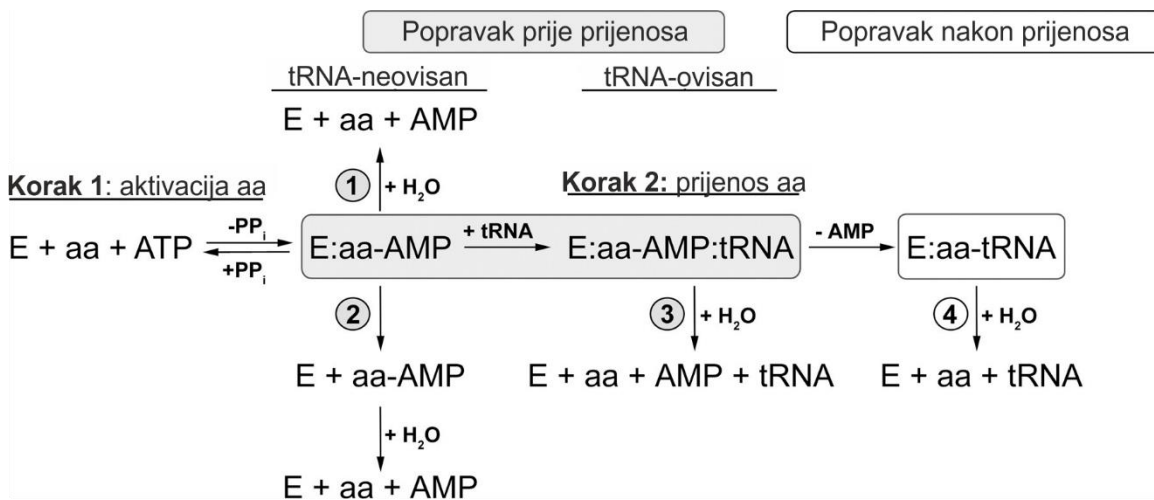
2 Kanonska uloga aminoacil-tRNA-sintetaza u prijenosu genetičke informacije

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji kataliziraju nastanak esterske veze između molekule tRNA i pripadne aminokiseline uz utrošak ATP-a. Nastale aminoacil-tRNA uglavnom služe kao supstrati u sintezi proteina na ribosomima, gdje uslijed sparivanja s odgovarajućim kodonom u mRNA služe kao donori pripadne aminoacilne skupine rastućem polipeptinom lancu. Zbog toga aaRS u stanici služe kao svojevrsni prevoditelji „jezika nukleotida“ u „jezik aminokiselina“. Poznate su 24 različite obitelji aaRS koje se, prema svojim strukturnim i mehanističkim karakteristikama, svrstavaju u dva razreda, koji se još dodatno dijele na nekoliko podrazreda (Perona & Hadd, 2012; Perona & Gruić-Sovulj, 2014). Neovisno o razredu, sve aaRS kataliziraju reakciju aminoaciliranja tRNA u dva jasno definirana koraka (mehanizam reakcije aminoaciliranja prikazan je na slici 2). U prvom koraku dolazi do nukleofilnog napada α -karboksilnog kiskovog atoma aminokiseline na α -atom fosfora ATP-a, pri čemu nastaju aminoacil-adenilat (aa-AMP) i molekula anorganskog pirofosfata (PP_i). Zatim u drugom koraku dolazi do nukleofilnog napada 3' ili 2' hidroksilne skupine terminalnog adenzina (A76) molekule tRNA na α -karbonilni ugljikov atom aa-AMP-a, čime dolazi do prijenosa aminoacilne skupine na molekulu tRNA uz otpuštanje AMP-a u otopinu. Hidroliza molekule PP_i katalizirana enzimskom aktivnošću anorganske pirofosfataze čini cjelokupnu reakciju aminoaciliranja termodinamički povoljnom (Nelson & Cox, 2012). Po pitanju reakcije aminoaciliranja, dva razreda aaRS se temeljno razlikuju u tome koriste li 2' ili 3' hidroksilnu skupinu prilikom aktivacije aminokiseline, te u ograničavajućem koraku same reakcije (Perona & Gruić-Sovulj, 2014).



Slika 2 Mehanizam reakcije aminoaciliranja uz naznaku razlike između aminoacil-tRNA-sintetaza razreda I i II. Slika je preuzeta i prerađena iz (Nelson & Cox, 2012).

Kako stanična mašinerija koja koristi aminoacil-tRNA u pravilu ne provjerava je li na molekulu tRNA vezana pripadna aminokiselina, točnost reakcije aminoaciliranja od iznimne je važnosti za pravilnu sintezu proteina i funkcioniranje stanice. Veličina, prisustvo modificiranih parova baza, te specifični strukturni elementi molekulama tRNA omogućuju ostvarivanje brojnih specifičnih interakcija s aaRS, čime se osigurava precizno prepoznavanje pripadne tRNA. Nasuprot tome, aminokiseline su male molekule koje nerijetko mogu nalikovati jedna drugoj što čini razlikovanje pripadne aminokiseline od nepripadne znatno težim. Čak 10 obitelji aaRS misacilira molekule tRNA u stopi nezanemarivoj za stanicu, zbog čega su razvile posebne mehanizme popravka pogreške (Perona & Gruić-Sovulj, 2014) (sumarno prikazani na slici 3). Popravak pogreške dijeli se na popravak prije i nakon prijenosa aminoacilne skupine na tRNA. Popravak prije prijenosa uključuje hidolizu pogrešnog aa-AMP-a koju može katalizirati sintetsko mjesto dane aaRS (Cvetesic i sur., 2015) ili ona može biti neenzimska uslijed otpuštanja aa-AMP u otopinu. Dodatno se dijeli na tRNA-ovisan i tRNA-neovisan ovisno o tome događa li se uz prisustvo ili nedostatak molekule tRNA. Popravak nakon prijenosa temelji se na hidrolizi esterske veze između nepripadne aminokiseline i tRNA u posebnoj domeni za popravak pogreške (korektivna domena). Ako dolazi do direktnog prijenosa 3'-kraja misacilirane tRNA iz sintetskog mjesta u korektivnu domenu taj popravak se naziva *in cis*, dok u slučaju kada se misacilirana tRNA prvo otpušta s aaRS, a zatim ponovo veže za korektivnu domenu se on zove *in trans* (Perona & Gruić-Sovulj, 2014).



Slika 3 Shematski prikaz mehanizama popravka pogreške aminoacil-tRNA-sintetaza. (1) tRNA-neovisan popravak pogreške u sintetskom mjestu enzima. (2) tRNA-neovisan popravak pogreške nakon disocijacije s enzima. (3) tRNA-ovisan popravak pogreške u sintetskom mjestu enzima. (4) Popravak pogreške nakon prijenosa u domeni za popravak. Slika je preuzeta i prilagođena prema (Cvetesic i sur., 2012).

3 Aminocil-tRNA-sintetaze kao mehanizam obrane od antibiotika

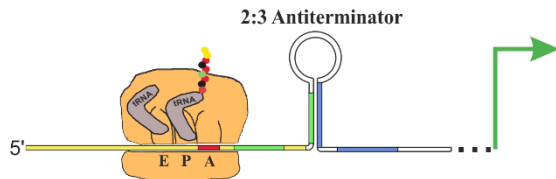
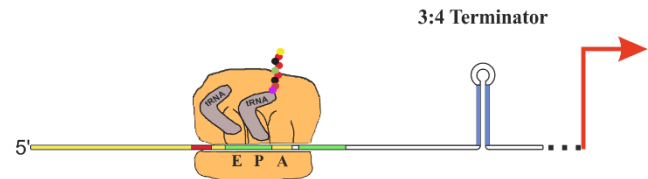
S obzirom na svoju neizostavnu ulogu u procesu prijenosa genetičke informacije i sinteze proteina, aminoacil-tRNA-sintetaze uvriježena su meta djelovanja raznih antibiotika (Hurdle i sur., 2005; Y. Travin i sur., 2021). Sojevi otporni na takve antibiotike u pravilu se mogu podijeliti na slabije do srednje otporne sojeve i visoko otporne sojeve. Za razliku od slabije do srednje otpornih sojeva, kod kojih je otpornost uglavnom posljedica mutacija u aktivnom mjestu odgovarajuće aaRS (Cookson, 1998; Gentry i sur., 2003; Poovelikunnel i sur., 2015; Yanagisawa & Kawakami, 2003), visoko otporni sojevi u pravilu ne posjeduju značajne mutacije u genu za aaRS. Daljnja istraživanja genoma visoko otpornih sojeva pokazala su postojanje dodatnih gena koji kodiraju aaRS otpornu na dani antibiotik (Gentry i sur., 2003; Vecchione & Sello, 2008; Yanagisawa & Kawakami, 2003). Kako je pokazano da mutacije u aktivnom mjestu aaRS uglavnom imaju negativan utjecaj na kinetičke parametre enzima i bakterijski rast (Green i sur., 2009; Yanagisawa & Kawakami, 2003), smatra se da je posjedovanje dodatne, inducibilne aaRS otporne na dani antibiotik selektivna prednost. U takvom sustavu bakterije tijekom normalnog rasta ekspimiraju glavnu staničnu aaRS, koja nerijetko posjeduje bolje kinetičke parametre, dok pri pojavi antibiotika dolazi do nagle i jake indukcije aaRS otporne na njegovo djelovanje, što omogućava preživljenje bakterije.

3.1 Triptofanil-tRNA-sintetaza otporne na djelovanje indolmicina i chuangxinmicina

U jeku rastuće otpornosti bakterija na standardno korištene antibiotike, farmakološka istraživanja su se okrenula i prema indolmicinu i chuangxinmicinu, strukturnim analogima L-triptofana koji kompetitivno inhibiraju bakterijsku triptofanil-tRNA-sintetazu (TrpRS). Indolmicin je sekundarni metabolit porijeklom iz bakterija *Streptomyces griesus* ATCC 12648 i *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, koji pokazuje značajan antimikroban učinak na kliničke izolate bakterije *Helicobacter pylori* (Kanamaru i sur., 2001) i MRSA (eng. *methilicin-resistant Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* otporan na metilicin) (Hurdle i sur., 2004). Slično indolmicinu, chuangxinmicin, porijeklom iz bakterije *Actinoplanes tsinanensis*, također pokazuje značajan antimikroban utjecaj na klinički relevantne bakterije (M. J. Brown i sur., 2002). Istraživanjem bakterija roda *Streptomyces* otkriveno je kako za otpornost na indolmicin i chuangxinmicin zaslužan gen koji kodira dodatnu TrpRS, nazvanu TrpRS1, koja se svojim strukturnim i biokemijskim svojstvima razlikuje od glavne stanične TrpRS, zvane TrpRS2.

Od 10 različitih vrsta roda *Streptomyces* u kojima su otkriveni ortolozi TrpRS1 i TrpRS2, najbolje su karakterizirane dvije TrpRS iz bakterije *Streptomyces coelicolor* (Kitabatake i sur., 2002; Vecchione & Sello, 2008, 2010). Kinetička istraživanja pokazala su kako je enzim TrpRS2 gotovo 4 puta efikasniji (mjereno kao omjer k_{cat}/K_M vrijednosti danih enzima) u reakciji aminoaciliranja, dok TrpRS1 posjeduje 150

puta veću konstantu inhibicije (K_i) za indolmicin (Kitabatake i sur., 2002). Daljnja *in vivo* istraživanja s nul-mutantima za gene *trpRS1* i *trpRS2* potvrdila su kako enzim TrpRS1 bakterijama omogućava rast uz prisustvo indolmicina, ali i uz prisustvo chuangxinmicina. Također je uočeno kako nul-mutant koji posjeduje isključivo TrpRS1, usprkos manjoj efikasnosti enzima, ne pokazuje razlike u fenotipu prilikom rasta u odsutnosti indolmicina i chuangxinmicina (Vecchione & Sello, 2008). Ekspresija gena *trpRS2* pokazala se konstitutivnom, dok je transkript gena *trpRS1* uočen u bakterijama koje su rasle uz prisustvo indolmicina, chuangxinmicina, te nul-mutantu za gen *trpRS2*, što je pokazalo kako je izostanak aminoacilacijske aktivnosti TrpRS2 dostatan signal za indukciju ekspresije TrpRS1 (Vecchione & Sello, 2008). Istraživanjem 157 nukleotida dugog vodećeg slijeda (eng. *leader sequence*) u transkriptu gena *trpRS1* otkriveno je kako se regulacija njegove ekspresije odvija atenuacijom transkripcije uz pomoć ribosoma, nalik na *trp* operon u bakteriji *Escherichia coli* (vidi sliku 4). Vodeći slijed sadrži 4 očuvane regije između kojih su moguća dva međusobno isključiva oblika sparivanja: stvaranje ukosnica 1:2 i 3:4, odnosno stvaranje ukosnice 2:3 (slika 4a). Kako se nizvodno od regije 4 nalazi A+U bogat slijed, smatra se da ukosnica 3:4 djeluje kao ρ -neovisan terminator, dok ukosnica 2:3 onemogućava sparivanje 3:4, čime djeluje kao antiterminator. Regija 1 je sadržana unutar malog, 39 nukleotida dugog, okvira čitanja koji kodira tzv. vodeći peptid (eng. *leader peptide*), a ovisno o bakterijskoj vrsti može sadržavati jedan ili dva triptofanska kodona. Smatra se da uslijed izostanka aktivnosti TrpRS2 i pada koncentracije triptofanil-tRNA^{Trp} dolazi do zastajkivanja ribosoma na triptofanskom kodonu, što omogućava potpunu transkripciju regije 3 i stvaranje antiterminatorske 2:3 ukosnice koja podržava transkripciju cijelog gena (slika 4b). Ako je u stanici prisutna dovoljna koncentracija aminoacilirane tRNA^{Trp}, ne dolazi do opisanog zastajkivanja ribosoma te on prekriva regiju 2, čime se potiče stvaranje ukosnice 3:4 i terminacija transkripcije (slika 4c) (Vecchione & Sello, 2010). Zanimljivo je kako je transkripcija gena *trpRS1* uočena i prilikom tretmana bakterija serin-hidroksatomom, inhibitorom seril-tRNA-sintetaze, što implicira ulogu i bakterijskog stresnog odgovora *stringent response* u regulaciji ekspresije TrpRS1 (Vecchione & Sello, 2008).

a**b****Transkripcija cijelog gena****c****Atenuacija transkripcije**

Slika 4 Regulacija ekspresije gena *trpRS2* u bakteriji *Streptomyces coelicolor* putem ribosomom-posredovane transkripcijske atenuacije. **a** Arhitektura vodećeg slijeda uz naznačene: vodeći peptid (žuto), Trp kodon u sklopu vodećeg peptida (crveno), regije 1 i 2 (zeleno), te regije 3 i 4 (plavo). Brojevi na 5' i 3' krajevima označuju udaljenost od inicijacijskog nukleotida. **b** Shematski prikaz antiterminacije transkripcije zbog zastajkivanja ribosoma na Trp kodonu uslijed nedostatka tripforanil-tRNA^{Trp} u stanici. **c** Shematski prikaz atenuacije transkripcije uslijed prisutnosti dovoljne razine tripforanil-tRNA^{Trp} u stanici. Slika je izrađena prema informacijama iz (Vecchione & Sello, 2010).

Istraživanjem bakterija *S. griseus* ATCC 12648 i *P. luteoviolacea* koje su prirodni proizvođači indolmicina, odnosno bakterije *A. tsinanensis* koja je prirodni proizvođač chuangxinmicina, otkriveno je kako sve tri bakterije posjeduju dodatne TrpRS u okviru genskih klastera zaduženih za biosintezu danog antibiotika (Du i sur., 2015, 2019; Shi i sur., 2018). Navedeni geni nisu biokemijski karakterizirani, no njihova uključenost u klasterima za biosintezu antibiotika upućuje kako bi mogli biti otporni na djelovanje istih (Granato i sur., 2019). Iako bakterije *S. griseus* ATCC 12648 i *P. luteoviolacea* obje posjeduju genski klaster za biosintezu indolmicina (*ind* klaster), mehanističke razlike u biosintetskom putu, te niska sličnost aminokiselinskih sljedova odgovarajućih proteina ukazuju na konvergentan razvoj samih klastera, pa tako i gena za TrpRS (Du i sur., 2019). Iznenadujuće je kako uz spomenuti gen u sklopu biosintetskog klastera, bakterija *S. griseus* ATCC 12648 posjeduje još 2 različita gena za TrpRS u svome genomu (Du i sur., 2015). Obje navedene TrpRS konstitutivno su eksprimirane, aminokiselinski sljedovi im se znakovito razlikuju od TrpRS u ostalim vrstama *Streptomyces*, a međusobno se razlikuju u otpornosti na indolmicin i chuangxinmicin (Vecchione & Sello, 2009). Smatra se da je prisutnost *ind* klastera, a s njime i pripadne TrpRS, posljedica horizontalnog transfera gena (Du i sur., 2015), no razlog za postojanje dvije konstitutivno eksprimirane TrpRS još uvijek nije razjašnjen.

U literaturi je uočen nedostatak cjelokupne analize rasprostranjenosti različitih oblika TrpRS među bakterijama. Ograničene analize ukazuju kako se TrpRS1 nalazi uglavnom u vrstama koljena *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacilli* i *Actinomycetia* (Vecchione & Sello, 2009), dok analogna analiza za TrpRS2 ne postoji. Osim u vrstama spomenutim u prethodnim paragrafima, prisustvo dvije ili više TrpRS uočeno je i u vrstama roda *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* i *Bacillus*

thuringiensis), gdje se regulacija ekspresije TrpRS1 također odvija atenuacijom transkripcije, ali preko T-box ribosklopke karakteristične za taj rod (Gutiérrez-Preciado i sur., 2009). Sveobuhvatna filogenetička analiza različitih TrpRS, nalik analizama na izoleucil-tRNA-sintetazama (IleRS) (Cvetesic i sur., 2016) i metionil-tRNA-sintetazama (J. R. Brown i sur., 2003), omogućila bi analizu njihovog porijekla, ali i potencijalnog horizontalnog širenja među bakterijskim vrstama. Dosadašnja istraživanja jasno ukazuju na razlog postojanja TrpRS1 u genomu – TrpRS1 daje bakterijama mogućnost aminoaciliranja tRNA^{Trp} u prisustvu tvari koje inhibiraju TrpRS2. Ipak, izostanak negativnog fenotipa u bakterijama koje posjeduju isključivo TrpRS1 otvara raspravu oko toga zašto neke bakterijske vrste posjeduju oba oblika TrpRS u svome genomu. Dano pitanje postaviti će se još nekoliko puta u ovome radu.

3.2 Metionil-tRNA-sintetaza otporne na djelovanje sintetskih inhibitora

Istražujući utjecaj prethodno identificiranih inhibitora metionil-tRNA-sintetaze (MetRS) (SB-362916, SB-430537 i SB-441513) na rast bakterije *Streptococcus pneumoniae*, Gentry i sur. (2003) otkrili su značajan broj visoko-otpornih sojeva. Daljnjim analizama utvrđeno je kako je za pojavu visoke otpornosti zaslužan gen koji kodira dodatnu MetRS, nazvanu MetRS2. Aminokiselinski slijed MetRS2 pokazuje najveću sličnost slijedu MetRS iz arheja i eukariota, što ukazuje da je prisustvo gena *metS2* u bakteriji *S. pneumoniae* vjerojatno posljedica horizontalnog prijenosa. Pretrage 315 kliničkih izolata bakterije *S. pneumoniae* pokazale su prisustvo gena *metS2* u čak 46 % izolata, ukazujući na njegovu globalnu raširenost. Prisustvo i MetRS1 i MetRS2 u jednom organizmu, uz *S. pneumoniae* uočeno je još i u bakterijama *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* i *Clostridium perfringens* (J. R. Brown i sur., 2003). To opažanje je posebice zabrinjavajuće s obzirom na to da su sve četiri navedene bakterije klinički relevantne: *S. pneumoniae* je uzročnik pneumonije i meningitisa, *B. anthracis* antraksa, *C. perfringens* plinske gangrene, a *B. cereus* raznih probavnih smetnji i kožnih infekcija.

Korišteni inhibitori u potpunosti su sintetski i ne nalikuju niti jednom poznatom prirodnom antibiotiku, što znači da bakterije nikada nisu niti bile izložene njihovom djelovanju. U tom kontekstu pojava i raširenost MetRS2 je posebice zanimljiva jer implicira da bakterije unutar svog genoma održavaju naizgled redundantan gen. Jedno od mogućih obrazloženja je da postoje prirodni inhibitori, nalik na sintetske inhibitore korištene u danom istraživanju, koji su stvarali selektivni pritisak za pojavu, održavanje, ali i širenje MetRS2 među bakterijskim populacijama (J. R. Brown i sur., 2003; Gentry i sur., 2003). Pretrage genoma bakterija koje sadrže MetRS2, kao i bakterija koje s njima dijele staništa, mogle bi polučiti otkrićem novih genskih klastera za biosintezu sekundarnih metabolita koji djeluju inhibitorno na MetRS. Ovakav pristup (što će biti navedeno i kasnije u tekstu) primjenjiv je i na ostale aaRS koje pridonose otpornosti na razne sekundarne metabolite.

3.3 Seril-tRNA-sintetaze odgovorne za sintezu i zaštitu od albomicina

Albomicin je sekundarni metabolit porijeklom iz nekih bakterija roda *Streptomyces* koji ulazi u bakterije preko transportera za željezo, a zatim kao analog seril-adenilata djeluje kao inhibitor seril-tRNA-sintetaze. Kao takav, albomicin u niskim koncentracijama pokazuje jako antimikrobno djelovanje protiv kliničkih izolata raznih bakterija rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus* (Y. Travin i sur., 2021). Kliničke studije koje potvrđuju njegovu iznimnu sigurnost (Gause, 1955), te nedavno opisana metoda za potpunu kemijsku sintezu (Z. Lin i sur., 2018) otvorile su vrata za buduću farmakološku primjenu albomicina i njegovih derivata. Stoga je od posebne važnosti temeljito istražiti način rada i širenja mehanizma koji bi mogli pridonijeti razvoju otpornosti na albomicin.

Istraživanje na genskom klasteru za biosintezu albomicina (*alb* klaster) u bakteriji *Streptomyces sp.* ATCC 700974 otkrilo je kako u *alb* klasteru postoji gen *alb10* koji kodira dodatnu SerRS, nazvanu SerRS2. Ona se svojim aminokiselinskim slijedom značajno razlikuje od glavne stanične SerRS, nazvane SerRS1. Oba enzima *in vitro* pokazuju jednaku efikasnost za reakciju aminoaciliranja, uz napomenu da SerRS2 ima 20 puta veće vrijednosti k_{cat} , te K_m za serin, u odnosu na SerRS1. S druge strane, *E. coli* u kojima je temperaturom inaktivirana nativna SerRS, uslijed komplementacije sa SerRS1 pokazuju jači rast u odnosu na one komplementirane sa SerRS2. Nadalje, heterologna ekspresije SerRS2 u divljem tipu bakterije *E. coli* rezultirala je znatnim porastom u otpornosti na albomicin, te njegov razgradni produkt SB-217452 (Zeng i sur., 2009). Regulacija ekspresije SerRS2 nije istražena, no smatra se da do njezine ekspresije dolazi zajedno s ostatkom *alb* klastera.

U kasnijim koracima biosinteze albomicina dolazi do nastanka veze između rastućeg prekursora i L-serina, za koji je potreban seril-adenilat kao donor serilne skupine. Kako albomicin inhibira rad SerRS1, vjeruje se da je upravo SerRS2 zaslužna za stvaranje navedenog seril-adenilata. Nadalje, smatra se da povišena K_m vrijednosti SerRS2 za serin ograničava sintezu albomicina na uvjere povišene koncentracije serina u bakteriji (Ushimaru i sur., 2020; Y. Travin i sur., 2021).

Bioinformatičkim pretragama otkriveno je postojanje genskih klastera nalik *alb* klasteru u čak 12 drugih bakterijskih vrsta. Polovicu su činili genski klasteri gotovo identični *alb* klasteru iz različitih vrsta roda *Streptomyces*, dok su preostali klasteri razvrstani u dvije grupe. Klasteri grupe 1 pronađeni su u bakterijama *Streptomyces sp. C* i *Streptomyces vitaminophilus*, te pokazuju visoku sličnost *alb* klasteru. Iako su se klasteri grupe 1 pokazali funkcionalnima, nedostatak nekih gena u odnosu na *alb* klaster ukazuje na drukčiji finalni produkt njihovog biosintetskog puta. Klasteri grupe 2 pronađeni u bakterijama koljena *Proteobacteria* i pokazuju značajne razlike u odnosu na *alb* klaster. Biosintetski putevi kodirani klasterima grupe 2, a ni njihovi produkti do sada nisu razjašnjeni. Zanimljivo je kako gotovo svi klasteri, neovisno o grupi, posjeduju gen za dodatnu SerRS, dok svi klasteri grupe 2 posjeduju gen za dodatnu AsnRS (Y. Travin

i sur., 2021). U skladu s prethodno opisanom ulogom SerRS2, produkti navedenih gena mogli bi sudjelovati u biosintezi nekog sekundarnog metabolita, odnosno obrani bakterije od njegovog djelovanja. Navedena otkrića ponovo ukazuju na važnost gena za aaRS kao determinanti genskih klastera za biosintezu raznih sekundarnih metabolita.

3.4 Izoleucil-tRNA-sintetaza otporna na djelovanje mupirocina

Izoleucil-tRNA-sintetaze svih živih organizama mogu se temeljem svojih strukturnih i biokemijskih karakteristika podijeliti na dva tipa: IleRS1 i IleRS2. Bakterije koljena *Proteobacteria* i *Firmicutes* uglavnom posjeduju IleRS1, dok se IleRS2 može pronaći u nekim vrstama koljena *Firmicutes* i *Spirochaetes*, te kao jedini oblik IleRS u vrstama koljena *Actinobacteria*, *Chlamydiae* i *Bacteroidetes*. Postojanje oba oblika IleRS u istoj bakteriji uočeno je u genomima bakterija iz obitelji *Bacillaceae* i bakteriji *P. fluorescens* NCIMB 10586 (J. R. Brown i sur., 2003; Cvetesic i sur., 2016; Zanki i sur., 2022), te u bakterijama rodova *Staphylococcus* i *Streptococcus* gdje je IleRS1 kodirana genomom, a IleRS2 plazmidom (do Carmo Ferreira i sur., 2011; Oliveira i sur., 2009).

Mupirocin je antibiotik porijeklom iz bakterije *Pseudomonas fluorescens* koji djeluje kao efikasan kompetitivni inhibitor IleRS1. Kao takav pokazuje iznimnu antimikrobnu aktivnost protiv većine Gram-pozitivnih i nekih Gram-negativnih bakterija reda *Bacilli* (Poovelikunnel i sur., 2015). Za razliku od IleRS1, IleRS2 u pravilu pokazuje visoku otpornost na djelovanje mupirocina, iako se razina otpornosti može značajno razlikovati od vrste do vrste (Cvetesic i sur., 2016; J. Hughes & Mellows, 1980; Zanki i sur., 2022). S obzirom na to da ljudi posjeduju IleRS2, mupirocin se koristi kao topikalni antibiotik u liječenju MRSA (Ammerlaan i sur., 2009; Coates i sur., 2009; Harbarth i sur., 1999), te raznih kožnih infekcija i inficiranih rana. Stoga su istraživanja mehanizama otpornosti na mupirocin od iznimne važnosti.

Biokemijske, kinetičke i regulacijske karakteristike oba tipa IleRS najbolje su istražene u bakteriji *Priestia megaterium* (Zanki i sur., 2022). S jedne strane IleRS2 se pokazala otpornijom na djelovanje mupirocina, dok se IleRS1 s druge strane pokazala kinetički superiornijim enzimom, koji podržava bržu stopu translacije. Ipak, zanimljivo je da usprkos tome ne postoji razlika u fenotipu nul-mutanata za IleRS1 i nul-mutanata za IleRS2. Valja napomenuti kako nije dobiven mutant kojemu nedostaje isključivo IleRS1, već su u procesu izgubljena i dva od šest nativnih plazmida divljeg soja, zbog čega ovom rezultatu treba oprezno pristupiti. Ipak, jasno je pokazano kako je IleRS2 i više nego dostatna za održavanje izoleucil-sintetazne aktivnosti u bakteriji *P. megaterium*. Ekspresija IleRS1 pokazala se konstitutivno što je u skladu s činjenicom da je promotor gena *ileS1* pod kontrolom glavne σ^{70} podjedinice. Nasuprot tomu IleRS2 nije eksprimirana u normalnim uvjetima, već je uočena njena snažna indukcija u prisustvu mupirocina, za koju se smatra da je posljedica međudjelovanja staničnog odgovora *stringent response* i T-box ribosklopke, koja regulira transkripciju gena ovisno o razini pripadne aminoacilirane tRNA u stanici.

Nadalje u kontroli ekspresije IleRS2 implicirani su i transkripcijski represori uključeni u SOS odgovor (LexA i ArgR2).

3.5 Ostale aminoacil-tRNA-sintetaze u zaštiti stanice od sekundarnih metabolita

Uz već spomenute klustere za biosintezu albomicina i indolmicina, geni za aaRS pronađeni su i u klasterima za biosintezu borrelidina (Olano i sur., 2004), mikrocin C (Y. Travin i sur., 2021), agrocina 84 (Reader i sur., 2005), tiomarinola (Fukuda i sur., 2011), te kladosporina (Cochrane i sur., 2016). Proteinski produkti navedenih gena u pravilu su slabo karakterizirani, te su kao takvi idealni kandidati za buduća istraživanja.

Borrelidin je makrolidni antibiotik porijeklom iz nekoliko vrsta roda *Streptomyces* koji djeluje kao nekompetitivni inhibitor bakterijskih i eukariotskih treonil-tRNA-sintetaza (ThrRS). Izražena antifungalna, antimikrobna, antimalarijska, ali i antiangiogena svojstva čine borrelidin i njegove analoge, poput borrelidina B, idealnim kandidatima za farmakološku primjenu (Olano i sur., 2004; Ruan i sur., 2005). Istraživanjem genskog klastera za biosintezu borrelidina (*bor* klaster) u bakteriji *Streptomyces parvulus* Tü4055 otkriven je gen *borO* koji kodira dodatnu ThrRS. Heterologna ekspresija gena *borO* u bakteriji *Streptomyces albus* podarila je bakteriji otpornost na borrelidin (Olano i sur., 2004). Navedeno ukazuje kako ThrRS kodirana genom *borO* služi u zaštiti bakterije od djelovanja borrelidina koji sama proizvodi.

Mikrocin C je mali peptidni antibiotik porijeklom iz nekih vrsta obitelji *Enterobacteriaceae* koji djeluje kao kompetitivni inhibitor aspartil-tRNA-sintetaze (AspRS) (Metlitskaya i sur., 2006). Potentan je inhibitor rasta nekoliko patogenih enterobakterija, što otvara vrata za njegovu primjenu u dizajnu probiotskih sojeva (Cursino i sur., 2006). Iako većina genskih klastera za biosintezu mikromicina C i njemu sličnih spojeva (*mmc* klasteri) posjeduju tri gena (*mmcF*, *mmcE* i *mmcH*) koji bakteriji pružaju otpornost na egzogeni i endogeni mikromicin, *mmc* klasteri iz nekih bakterija koljena *Actinobacteria* posjeduju gen za dodatnu AspRS (Y. Travin i sur., 2021). Iako karakteristike navedene AspRS za sada nisu poznate, moguće je da nalik na prethodno opisane aaRS sudjeluje u obrani bakterije od djelovanja mikromicina C i njemu sličnih spojeva.

Agrocin 84 sekundarni metabolit porijeklom iz bakterije *Rhizobium rhizogenes* K84¹ koji djeluje kao inhibitor leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS). Od iznimne je ekonomske važnosti jer pruža efikasan način biokontrola sojeva *Rhizobium radiobacter* koji uzrokuju tumor vrata korijena (Kerr & Bullard, 2020). Genski klaster za biosintezu agrocina 84 (*agn* klaster) nalazi se na konjugativnom plazmidu pAgK84, te sadrži gen *agnB2* koji kodira dodatnu LeuRS. Dodatna LeuRS *in vitro* je 1000 puta manje osjetljiva na

¹ Bakterija *Rhizobium rhizogenes* K84 se u literaturi još može pronaći pod svojim zastarjelim imenom *Agrobacterium radiobacter* 84, dok se bakterija *Rhizobium radiobacter* može pronaći pod imenom *Agrobacterium tumefaciens*.

inhibiciju agrocinom 84 u odnosu na glavnu LeuRS u stanici, što ukazuje na njezinu zaštitnu ulogu u bakterijama koje sintetiziraju agrocin 84 (Reader i sur., 2005). U raznim bakterijama koljena *Actinobacteria* pronađeni su biosintetski klasteri koji nalikuju *agn* klasteru. Zanimljivo je kako gotovo svi ti klasteri sadrže gen za dodatnu MetRS, što može ukazivati da je funkcija MetRS potrebna za biosintezu odgovarajućeg sekundarnog metabolita, odnosno da je inhibicija MetRS cilj djelovanja inhibitora, od kojega dodatna MetRS pruža zaštitu (Y. Travin i sur., 2021).

Tiomarinoli su skupina sekundarnih metabolita porijeklom iz bakterije *Pseudoalteromonas* sp. SANK 73390 koji djeluju kao inhibitori izoleucil-tRNA-sintetaze. Riječ je o hibridnim spojevima koji se sastoje od analoga pseudomonične kiseline i pirotinskog bicikličkog prstena. Od posebnog su interesa u farmakološkoj industriji zbog svojeg antibiotskog djelovanja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (Shiozawa i sur., 1993), te izolate MRSA otporne na djelovanje mupirocina (Fukuda i sur., 2011). Produkcija tiomarinola, ali i otpornost na njegovo djelovanje, ovisi o biosintetskom genskom klasteru (*tlm* klaster) koji se nalazi na plazmidu pTML1. Unutar *tml* klastera nalazi se gen *tmlM* koji kodira dodatnu IleRS, čija heterologna ekspresija u *E. coli* pruža bakteriji visoku otpornost na djelovanje tiomarinola (Fukuda i sur., 2011). Navedeni rezultat ukazuje kako TmlM bakteriji omogućava sposobnost aminoacilacije tRNA^{Ile} i ugradnje izoleucina u proteine u prisustvu tiomarinola.

Iako je tematika rada vezana za bakterije, kako bi se ukazala raširenost aaRS kao obrambenih mehanizama u sklopu genskih klastera za biosintezu antibiotika, slijedi kratki osvrt i na sličnu pojavu u eukariotskim organizmima. Kladosporin je izokumarinski antibiotik porijeklom iz gljive *Cladosporium cladosporoides*, ali i nekih vrsta rodova *Chaetomium*, *Penicillium*, *Eurotium* i *Aspergillus*, koji djeluje kao potentan inhibitor lizil-tRNA-sintetaze (LysRS). Njegova antimikrobna, antifungalna, a posebice antimalarijska svojstva čine ga obećavajućim za farmakološku primjenu (Wang i sur., 2016). Unutar genskog klastera za biosintezu kladosporina (*cla* klaster) uočen je gen *cla4* koji kodira dodatnu LysRS. Iako enzim Cla4 nije biokemijski okarakterizirana, pokazuje strukturne sličnosti s LysRS iz *Saccharomyces cerevisiae* koja je otporna na inhibiciju kladosporinom (Cochrane i sur., 2016). Iz toga se daje zaključiti da Cla4 štiti stanice od djelovanja kladosporina kojeg proizvode.

Gotovo sve dodatne aaRS navedene u ovom poglavlju nisu adekvatno biokemijski i strukturno karakterizirane, te se saznanja o njihovom djelovanju temelje na ograničenim *in vivo* eksperimentima i strukturnim indikacijama. Posebice je problematičan nedostatak kvalitetnih filogenetičkih analiza, te analiza rasprostranjenosti danih gena u bakterijskim populacijama i kliničkim izolazima. Kako navedeni sekundarni metaboliti pokazuju visok farmakološki potencijal, horizontalno širenje odgovarajućih gena za otpornost potencijalno predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, te je od iznimne važnosti pravovremeno ga uočiti.

4 Aminoacil-tRNA-sintetaze u sklopu biosinteze sekundarnih metabolita

Osim svoje kanonske uloge u biosintezi proteina, aminoacilirane tRNA u bakterijama sudjeluju i u drugim esencijalnim procesima poput sinteze peptidoglikana, modifikacije stanične membrane, označavanju proteina za degradaciju, te biosintezi raznih tetrapirola. Istraživanja provedena tijekom zadnja dva desetljeća ukazala su i na veliku ulogu aminoacilirane tRNA u biosintetskim putevima raznih sekundarnih metabolita (Moutiez i sur., 2017). Većina takvih biosintetskih puteva koristi aminoaciliranu tRNA nastalu uslijed aktivnosti glavne stanične aminoacil-tRNA-sintetaze, no postoje i biosintetski klasteri koji kodiraju vlastite aaRS koje često pokazuju drukčija strukturna i biokemijska svojstva. Već je spomenut primjer enzima SerRS2 u sklopu *alb* klastera koji stvara seril-adenilat potreban u biosintetskom putu albomicina (Vidi poglavlje 2.2). Biosinteza valanimicina 22 i sulfonamidnih antibiotika također ovisi o aktivnosti dodatne aaRS, kodirane genom u sklopu danog biosintetskog klastera.

Valanimicin 22 je prirodni azoksi antibiotik porijeklom iz bakterije *Streptomyces viridifaciens* MG456-hF10. Uočeno je da pokazuje blaga antibakterijska i antitumorska svojstva (Yamato i sur., 1986), no točan mehanizam njegovog djelovanja još uvijek nije poznat. Jedan od završnih koraka sinteze valanimicina 22 uključuje prijenos serilne skupine sa seril-tRNA^{Ser} na rastući prekursor. Smatra se da je za nastanak seril-tRNA^{Ser} potrebne u biosintezi valanimicina 22 zaslužna dodatna SerRS, kodirana genom *vlmL* unutar biosintetskog klastera za sintezu valanimicina 22 (*vlm* klaster). To pokazuje činjenica da disrupcijom gena *vlmL* dolazi do značajno smanjene sinteze valanimicina 22. Ipak, kako ne dolazi do potpunog izostanka sinteze, vjeruje se da u izostanku aktivnosti VlmL bakterija može koristiti i seril-tRNA^{Ser} koja je produkt glavne stanične SerRS, zvane SvsR (Garg i sur., 2002). U usporedbi sa SvsR, VlmL se pokazao oko 4 puta manje efikasnim za reakciju aktivacije serina, ali gotovo 6 puta efikasnijim za ukupnu reakciju aminoaciliranja (Garg i sur., 2006), što bi moglo objasniti pad u razini sinteze valanimicina 22 uslijed disrupcije VlmL. Nadalje, VlmL se znatno razlikuje od SvsR i njenih homologa u slijedu svoje N-terminalne domene, koja u SerRS inače služi za vezanje pripadne tRNA. Moguće je da promijene u N-terminalnoj domeni VlmL omogućavaju interakcije s drugim proteinima *vlm* klastera i svojevrsnu kompartmentalizaciju biosintetskog procesa (Garg i sur., 2006). Daljnjim traženjem ortologa gena *vlmL*, u genomima bakterija *Streptomyces avermitilis* i *Frakia* sp. pronađeni su genski klasteri koji svojim slijedom i arhitekturom iznimno podsjećaju na *vlm* klaster (Garg i sur., 2006).

U potrazi za novim inhibitorima izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS), Stefanska i sur. (2000) su iz bakterije *Streptomyces* sp. NCIMB40513 izolirali dva sulfonamida, SB-203207 i SB-203208, koji izrazito inhibiraju aktivnost IleRS iz raznih bakterija i sisavaca. Navedeni spojevi pokazuju visoku sličnost s

altemicidinom, sulfonamidom koji ima izražena insekticidna i antitumorska svojstva. Gotovo 20 godina kasnije, pretragom genoma bakterije *Streptomyces* sp. NCIMB40513 za genima koji kodiraju IleRS, otkrivena su dva gena, *Ssp-IleRS* i *sbzA* (Hu i sur., 2019). Gen *sbzA* nalazi se unutar 20 kb velikog genskog klastera za biosintezu navedenih sulfonamida (*sbz* klaster). Enzim SbzA u pravilu katalizira reakciju prijenosa izoleucilne skupine s izoleucil-tRNA^{Ile} na rastući prekursor, ali u odsutnosti Ssp-IleRS može katalizirati i reakciju aminoaciliranja, no s manjom efikasnošću. Nažalost, kinetički parametri enzima SbzA i Ssp-IleRS, kao i njihova osjetljivost na djelovanje danih sulfonamida, do sada nisu ustanovljeni. Ipak, proteinski ekstrakt iz bakterije *Streptomyces* sp. NCIMB40513 koji sadrži sve stanične aminoacil-tRNA-sintetaze pokazao je više od 200 puta manju osjetljivost na djelovanje SB-203207 u odnosu na proteinske ekstrakte iz srodnih bakterijskih vrsta i te štakora (Stefanska i sur., 2000). Kako u *sbz* klasteru nije identificiran neki drugi gen koji bi pružao otpornost na djelovanje navedenih sulfonamida, može se pretpostaviti da, nalik na ostale biosintetske klastere, upravo enzim SbzA ispunjava tu ulogu.

Dva opisana primjera jasno ukazuju na potencijal gena za dodatne aaRS u otkrivanju novih genskih klastera za biosintezu sekundarnih metabolita.

5 Aminoacil-tRNA-sintetaze u zaštiti stanica od D-aminokiselina

Svi poznati organizmi sintetiziraju, te tijekom sinteze proteina koriste gotovo isključivo L-aminokiseline. Međutim, u bakterijama, D-aminokiseline, u pravilu dobivene iz svojih L-enantiomera katalitičkim djelovanjem enzima racemaza, igraju važnu ulogu u sintezi i regulaciji svojstava peptidoglikanskog omotača (Aliashkevich i sur., 2018; Lam i sur., 2009). Nadalje, u bakteriji *Bacillus subtilis* D-aminokiseline služe u neribosomskoj sintezi membranskih lipoproteina antimikrobnih i antifungalnih svojstava poput sufraktina, iturina i fengicina (Ongena & Jacques, 2008), te tijekom procesa razgradnje i razlaganja biofilmova (Kolodkin-Gal i sur., 2010). S druge strane, D-aminokiseline, a posebice D-tirozin, mogu se ugraditi u stanične proteine čime inhibiraju rast bakterijskih kultura i uspostavljanje biofilmova (Champney & Jensen, 1969, 1970; Leiman i sur., 2013). S obzirom da glavna stanična tirozil-tRNA-sintetaza TyrS ne razlikuje D-Tyr od L-Tyr u zadovoljavajućoj mjeri (Leiman i sur., 2015), mnogi mikroorganizmi posjeduju gen *dtd* koji kodira D-tirozil-tRNA deacilazu, enzim koji katalizira hidrolitičko cijepanje esterske veze između tRNA^{Tyr} i D-Tyr (Calendar & Berg, 1967; Soutourina i sur., 2000). Ipak, otkriveno je kako uobičajeni laboratorijski sojevi bakterije *B. subtilis* 3610 i 168 posjeduju mutaciju koja inaktivira gen *dtd*, čineći bakterije osjetljive na inhibitorno djelovanje D-Tyr (Leiman i sur., 2013). Upravo ta činjenica je potakla istraživanja mogućih alternativnih mehanizama tolerancije prema D-Tyr u navedenim sojevima *B. subtilis*.

Krajem prošlog stoljeća, postepenim sekvencioniranjem genoma bakterije *B. subtilis*, otkriven je gen *tyrZ* koji kodira dodatnu, naizgled suvišnu tirozil-tRNA-sintetazu (TyrRS) (Glaser i sur., 1991). Istraživanja na mutantima otpornima na D-Tyr otkrila su kako mutacija A202V u glavnoj staničnoj TyrRS, zvanom TyrS, uzrokuje promjenu geometrije veznog mjesta za Tyr što povećava njegovu specifičnost za L-Tyr naspram D-Tyr gotovo 7 puta, dok je posebice zanimljivo bilo otkriće da sličnu geometriju veznog mjesta posjeduje i prethodno navedeni enzim TyrZ (Leiman i sur., 2015). Paralelna istraživanja pokazala su kako je enzim TyrZ pokazala su kako je on 170 puta manje efikasan u aktivaciji D-Tyr, te 7 puta manje efikasan u aktivaciji L-Tyr u odnosu na TyrS. Ti rezultati ukazuju kako je TyrZ općenito manje efikasan enzim, ali je znatno specifičniji za L-Tyr naspram D-Tyr u odnosu na TyrS, što i potvrđuje činjenica da TyrZ podržava rast biofilmova i uz prisustvo inče inhibitornih koncentracija D-Tyr (Williams-Wagner i sur., 2015). Usprkos manjoj efikasnosti TyrZ, istraživanjem nul-mutanata za gene *tyrS* i *tyrZ* ustvrđeno je kako u odsutnosti D-Tyr oba gena jednako dobro podržavaju bakterijski rast i u bogatim i u minimalnim medijima. Regulacija ekspresije TyrS odvija se pomoću T-box ribosklopke (Grundy & Henkin, 1993; Henkin i sur., 1992), dok regulacija ekspresije TyrZ uz T-box ribosklopku uključuje i transkripcijski represor *dtrR* iz obitelji regulatora MarR, zaduženog za regulaciju gena uključenih u metabolizam, stresne odgovore, transportne sustave i virulenciju (Williams-Wagner i sur., 2015). Valja napomenuti kako još uvijek nisu

poznati točni uvjeti koji potiču otpuštanje represora DtrR i derepresiju gena *tyrZ*. Skupno, navedeni rezultati upućuju kako TyrS u normalnim uvjetima rasta služi kao glavna TyrRS u bakteriji *B. subtilis*, dok ju TyrZ štiti od inhibitornog utjecaja D-Tyr na rast kultura i formaciju i biofilmova.

Zanimljivo je kako bakterije *Thermotoga maritima*, *Aquifex aeolicus*, *Thiobacillus ferrooxidans*, te neke vrste reda *Proteobacteria* sadrže isključivo gen *tyrZ* (Williams-Wagner i sur., 2015), što dodatno potvrđuje kako je enzim TyrZ sposoban samostalno podržavati bakterijski rast. S obzirom na to da smanjena *in vitro* efikasnost enzima TyrZ naizgled ne predstavlja veliki problem za bakterije *in vivo*, a njegova ekspresija omogućava bakteriji rast uz prisustvo inače inhibitornih koncentracija D-Tyr, postavlja se pitanje zašto *B. subtilis*, ali i neke druge bakterijske vrste, poput *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium acetobutylicum* i *Clostridium botulinum*, posjeduju obje vrste TyrRS (Williams-Wagner i sur., 2015). Jedno od mogućih obrazloženja leži u različitoj osjetljivosti TyrS i TyrZ na djelovanje različitih inhibitora. Naime, Williams-Wagner i sur., (2015) navode kako je opažena razlika u osjetljivosti dvije TyrRS na analoge tirozina u bakteriji *B. subtilis*. Sukladno s time, istraživanja na bakteriji *P. aeruginosa* također su pokazala različit utjecaj sintetskih inhibitora na aktivnost TyrS i TyrZ (Hughes i sur., 2020). Stoga je zaista moguće da TyrS, osim kanonske uloge aminiaciliranja tRNA^{Trp}, donosi bakterijama otpornost na razne inhibitore.

6 Aminoacil-tRNA-sintetaze implicirane u sporulaciji

U bakteriji *Bacillus subtilis* su krajem prošlog stoljeća otkriveno je postojanje dodatne ThrRS (Putzer i sur., 1990) i ValRS (Ohyama i sur., 1977). Na njima su provedena ograničena istraživanja koja ukazuju da oba enzima možebitno sudjeluju u procesu sporulacije.

Geni *thrS* i *thrZ* kodiraju dvije ThrRS koje se međusobno znatno razlikuju u svojem aminokiselinskom slijedu. Enzim ThrS pokazuje konstitutivnu ekspresiju tijekom bakterijskog rasta, dok se ThrZ pokazao inducibilnim, te nije eksprimiran tijekom normalnog rasta, osim u slučaju disrupcije gena *thrS*. Zanimljivo je kako bakterije koje posjeduju samo *thrS* jednako dobro rastu, te prolaze procese sporulacije i germinacije kao i bakterije koje posjeduju isključivo *thrZ* (Putzer i sur., 1992). Regulacija ekspresije ThrS i ThrZ prema dosadašnjim saznanjima odvija se na 3 razine: na razini promotora, antiterminacije T-box ribosklopkom, te procesiranja gotovog transkripta endonukleazama. Gen *thrS* je pod kontrolom promotora koji prepoznaje glavnu σ -podjedinicu SigA što upućuje da je riječ o glavnoj staničnoj ThrRS (Putzer i sur., 1992). S druge strane, gen *thrZ* je pod kontrolom promotora alternativne σ -podjedinice, SigH koja regulira gene zadužene u dijelovima procesa sporulacije (Putzer i sur., 1990). Ekspresija oba gena je pod kontrolom T-box ribosklopke (Putzer i sur., 1990, 1992; Gendron i sur., 1994) koja potiče atenuaciju transkripcije u uvjetima dovoljne razine Thr-tRNA^{Thr}, stvarajući terminatorske strukture. Upravo zato je ekspresija obje ThrRS uočena u uvjetima starvacije treoninom (Putzer i sur., 1992), kada uslijed nedostatka Thr-tRNA^{Thr} umjesto terminatorske, dolazi do formacije antiterminatorske strukture, a posljedično i potpune transkripcije gena. Ipak, geni se razlikuju u tome što vodeći slijed *thrS* sadrži samo jednu T-box ribosklopku, dok ih vodeći slijed *thrZ* sadrži čak tri, što ukazuje na znatno strožu kontrolu njegove ekspresije (Putzer i sur., 1992). Završnu razinu kontrole oba gena provode endonukleaze J1 i J2 koje cijepanjem mRNA, preferentno u antiterminatorskoj strukturi, dovode do nastajanja kraćeg i znatno stabilnijeg transkripta. Vjeruje se da u uvjetima nedostatka Thr-tRNA^{Thr} nakon transkripcije dolazi do reformacije antiterminatorskih struktura u molekulama mRNA, što potiče njihovo cijepanje i nastajanje stabilnije forme transkripta, koja zatim osigurava dugotrajniju ekspresiju ThrS i ThrZ (Condon i sur., 1996; Even i sur., 2005). Takva „suradnja“ mehanizama T-box ribosklopke i procesiranja mRNA pretpostavlja se i u ostalim aaRS u bakteriji *B. subtilis*. Oba gena za ThrRS, kao i uočeni raspored T-box ribosklopki uočeni su i u genomima još nekih bakterija roda *Bacillus* (*Bacillus clausii* i *Bacillus pumilus*) (Gutiérrez-Preciado i sur., 2009). Skupno, ekspresija gena *thrZ* pokazuje znatno stroži oblik regulacije koji osigurava njegovu ekspresiju u vrlo specifičnim uvjetima u stanici. Razlog postojanja dva gena za ThrRS u genomu još uvijek nije poznat, no alternativna σ -podjedinica SigH upućuje na možebitnu ulogu ThrZ u procesu sporulacije.

Uspoređujući proteinske ekstrakte iz stanica bakterije *B. subtilis* u vegetativnom rastu i onih u procesu sporulacije, Ohyama i sur. (1977) uočili su postojanje valil-tRNA-sintetaze (ValRS) aktivnosti u dvije

skupine kromatografskih frakcija koje se eluiraju pri različitim koncentracijama NaCl. Uočenu razliku su atribuirali različitim formama ValRS, koje su nazvali E-I i E-II. Forma E-II činila je glavninu uočene ValRS aktivnosti tijekom cijelog staničnog ciklusa bakterije. Ipak, relativni udio aktivnosti E-II pokazao se značajan tijekom završetka procesa sporulacije, za razliku od aktivnosti E-I čiji je udio pokazao značajan skok u ranim fazama sporulacije (Ohyama i sur., 1983). Sukladno tim rezultatima, forma E-II predstavlja glavnu staničnu ValRS, dok forma E-I predstavlja ValRS s možebitnom ulogom u ranim fazama sporulacije. Nadalje, E-I i E-II se razlikuju i u svojoj specifičnosti za dvije izoakceptorske tRNA^{Val}, tako da E-II uglavnom aminoacilira tRNA₁^{Val}, dok E-I podjednako aminoacilira i tRNA₁^{Val} i tRNA₂^{Val} (Ohyama i sur., 1983). Razlika u specifičnosti za izoakceptore u kombinaciji s prethodno opisanim promjenama razine aktivnosti formi E-I i E-II rezultira povećanjem koncentracije valil-tRNA₂^{Val} i padom koncentracije valil-tRNA₁^{Val} u bakterijama u ranim fazama sporulacije (Ohyama i sur., 1984). Promijene relativnog omjera izoakceptorskih tRNA u stanici i njezina potencijalna uloga u procesu sporulacije već ranije je uočena i kod tRNA^{Leu}, no još uvijek nije razriješena (Chuang & Doi, 1972). Ipak, dobiveni rezultati nedvojbeno pokazuju kako različite forme ValRS imaju neku ulogu u ranijim stadijima sporulacije u bakteriji *B. subtilis*. Valja napomenuti kako u genomu *B. subtilis* za sada potvrđen samo gen *valS* čiji proteinski produkt karakteristikama odgovara formi E-II, dok u literaturi nisu niti uočeni pokušaji za pronalaskom gena koji bi kodirao formu E-I. Ipak, pokazano je kako disrupcija gena *valS* nije letalna, što pruža čvrst dokaz kako u genomu *B. subtilis* postoji barem još jedan gen za ValRS (Luo i sur., 1997), a koji bi mogao odgovarati formi E-I.

Daljnja kinetička i genetička istraživanja mogla bi preciznije ukazati na ulogu navedenih aaRS u bakteriji *B. subtilis* i njenom procesu sporulacije. U skladu s time, za otkriće njihovih uloga od velike važnosti je razjasniti i ulogu različitih omjera izoakceptora u procesu inicijacije sporulacije. Nadalje, bilo bi zanimljivo istražiti je li postojanje dodatnih ThrRS i ValRS specifično za bakteriju *B. subtilis* ili su one prisutne i u drugim bakterijama koje sporuliraju.

7 Lizil-tRNA-sintetaza u stresnoj signalizaciji bakterije *E. coli*

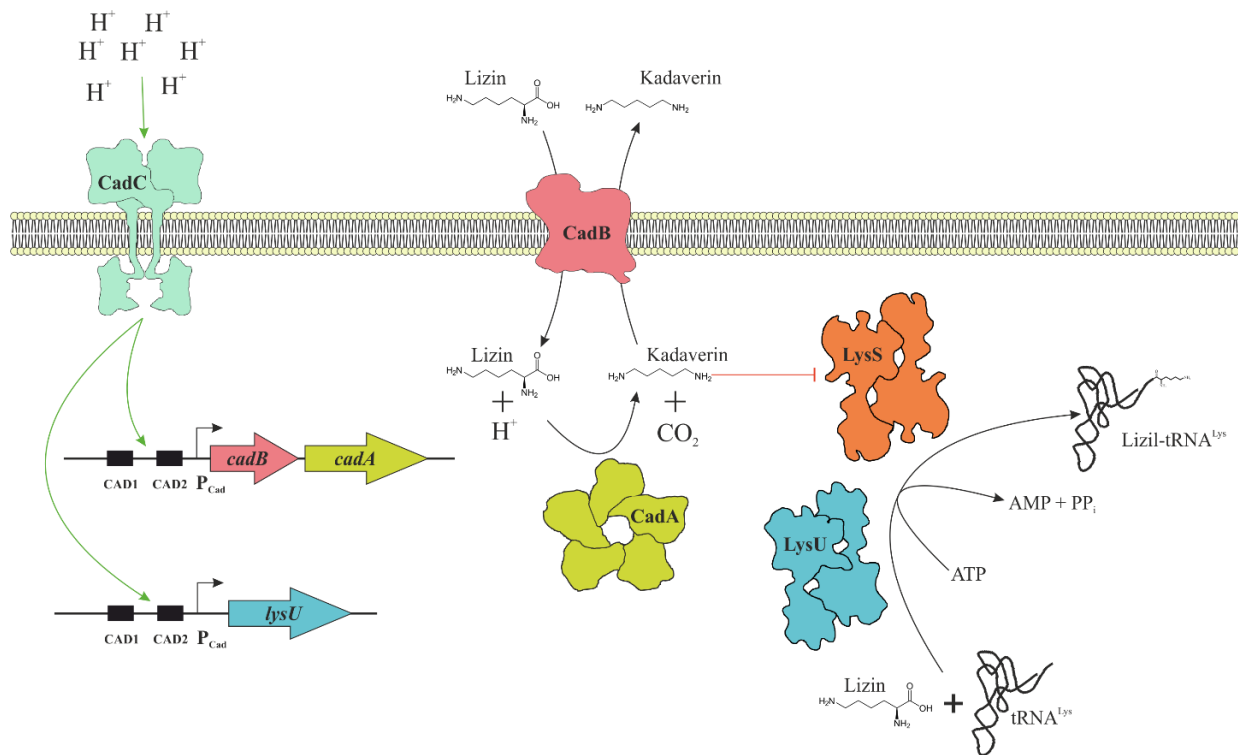
Za razliku od svih ostalih aaRS, koje su kodirane samo jednim genom, bakterija *E. coli* u svojem genomu posjeduje dva gena koji kodiraju lizil-tRNA-sintetaze (LysRS) zvane *lysS* i *lysU*. Njihovi proteinski produkti pokazuju iznimno visoku sličnost u aminokiselinskom slijedu, izoelektričnim točkama, veličini monomera i peptidnim mapama (Clark & Neidhardt, 1990). Kinetički parametri pokazuju kako je LysS otprilike dvostruko efikasnija u reakciji aminoaciliranja tRNA^{Lys} od LysU, dok obratno vrijedi za reakciju aktivacije lizina (Brevet i sur., 1995). Oba enzima u stanju su podržati bakterijski rast pri normalnoj temperaturi, no pokazuju različite karakteristike prilikom rasta prvi povišenoj, odnosno sniženoj temperaturi. Nul-mutanti za gen *lysS* lošije rastu pri sniženoj temperaturi (Lévêque i sur., 1991), dok se kod nul-mutanata za *lysU* u nekim istraživanjima uočava znatno lošiji rast pri povišenoj temperaturi (Clark & Neidhardt, 1990), a u nekima se ne uočava gotovo nikakva razlika (Lévêque i sur., 1991). Takav rezultat, u kombinaciji s visokom temperaturnom stabilnošću LysU (Theoclitou i sur., 1996) koja je gotovo 2,5 puta veća od temperaturne stabilnosti LysS (Brevet i sur., 1995), ukazuje da LysU održava aktivnost aminoaciliranja tRNA^{Lys} u *E. coli* pri uvjetima povišene temperature. S druge strane, lošiji rast nul-mutanata za *lysS* pri nižim temperaturama smatra se posljedicom gašenja ekspresije *lysU*, čime dolazi do nedostatka lizil-tRNA-sintetazne aktivnosti u bakterijskim stanicama (Lévêque i sur., 1991).

Postoji značajna razlika u regulaciji ekspresije LysS i LysU, koja je i reflektirana u njihovim različitim funkcijama. Gen *lysS* konstitutivno je eksprimiran u stanicama u svim uvjetima rasta što ukazuje na njegovu ulogu glavne stanične LysRS (Clark & Neidhardt, 1990). Nasuprot tome, *lysU* posjeduje iznimno nisku bazalnu razinu ekspresije, a inducira se tijekom rasta u specifičnim uvjetima rasta koji uključuju: prisustvo L-alanina, L-leucina, L-glicil-leucina ili D-fruktoze, rast u anaerobnim uvjetima ili uvjetima niskog pH, te rast u uvjetima povišene temperature. Zanimljivo je kako za razliku od aaRS navedenih u prethodnim poglavljima, LysS i LysU međusobno ne utječu na svoju ekspresiju, te uslijed pada aktivnosti LysS ne dolazi do porasta aktivnosti LysU i obratno (Lévêque i sur., 1991).

Iako su stanične membrane svih organizama, pa tako i bakterija, nepropusne za slobodnu difuziju vodikovih protona, rast u uvjetima niske pH vrijednosti u pravilu rezultira zakiseljavanjem bakterijske citoplazme. Za to su odgovorne molekule poput slabih organskih kiselina, koje se na niskom pH izvan stanice protoniraju, te time prelaze u svoj neutralan, lipofilan oblik koji lako difundira kroz staničnu membranu. Dolaskom u citoplazmu gdje vladaju uvjeti višeg pH, slabe organske kiseline se ponovo deprotoniraju, čime postupno smanjuju unutarstaničnu pH vrijednost (Hirshfield i sur., 2003; Lund i sur., 2020). Nadalje, tijekom rasta u anaerobnim uvjetima u bakterijama često dolazi do nemogućnosti održavanja stabilnog pH gradijenta na membrani i posljedičnog pada unutarstanične pH vrijednosti (Lévêque i sur., 1991). Stoga se smatra da je zakiseljavanje citoplazme signal za indukciju ekspresije LysU

tijekom rasta u uvjetima niske izvanstanične pH vrijednosti, ali i rasta u anaerobnim uvjetima. Uočeno je kako se uzvodno od gena *lysU* i gena *cadB* nalazi gotovo identičan 27 nukleotida dugačak slijed, što ukazuje na možebitnu zajedničku razinu regulacije (Lévêque i sur., 1991). Gen *cadB* skupa s genom *cadA* čini operon *cadBA* koji služi u staničnom odgovoru *E. coli* na rast u uvjetima niskog pH. Proteinski produkt *cadA* je citoplazmatska lizin-dekarboksilaza koja, uz utrošak jednog vodikovog iona, lizin pretvara u kadaverin i CO₂. Nastali kadaverin se zatim u zamjenu za lizin izbacuje iz stanice transmembranskim antiporterom za koji kodira *cadB* (Tetsch i sur., 2008). Operon *cadBA* je pod kontrolom promotora P_{Cad} koji sadrži dva vezna mjesta, CAD1 i CAD2, za transmembranski transkripcijski aktivator CadC. Slijed koji su Lévêque i sur. (1991) uočili uzvodno od gena *cadB* i *lysU* upravo je dio veznog mjesta CAD1 (Küper & Jung, 2005). U uvjetima dostatne koncentracije lizina i niskog pH, CadC formira dimer i prolazi kroz nekoliko konformacijskih promjena te vezanjem na vezna mjesta CAD1 i CAD2 omogućava ekspresiju *cadB* i *cadA* (Brameyer i sur., 2019; Haneburger i sur., 2011), a s njima i *lysU*. Na taj način bakterija *E. coli*, uz utrošak izvanstaničnog lizina, izbacuje višak H⁺ iona iz citoplazme. Ipak, navedeni sustav ima problem utoliko da u stanici prolazno smanjuje koncentraciju lizina, a povećava koncentraciju kadaverina, koji može djelovati kao kompetitivni inhibitor LysRS (Brevet i sur., 1995). Upravo se tu u priču uklapa paralelna ekspresija LysU i *cad* sustava. Naime, pri uvjetima u kojima je *cad* sustav aktivan, LysU pokazuje 6 puta veću otpornost na inhibiciju kadaverinom od LysS (Brevet i sur., 1995). Stoga se smatra da je jedna od uloga LysU osiguravanje stanične lizil-tRNA-sintetazne aktivnosti od nakupljanja kadaverina uslijed aktivnosti *cad* sustava. Ukupna shema rada *cad* sustava i *lysU* u bakteriji *E. coli* prikazana je na slici 5.

Takva organizacija, gdje postoji dodatna aaRS koja je pod istom regulacijom kao i sustav za sintezu biogenog amina, uočena je i u sustavima za sintezu tiramina u bakteriji *Enterococcus durans* (Linares i sur., 2012), te histamina (Diaz i sur., 2020; Martín i sur., 2005) u bakterijama roda *Lactobacillus*. Generalan princip rada je identičan *cad* sustavu: uz utrošak jednog vodikovog iona odgovarajuća dekarboksilaza histidin, odnosno tirozin pretvara u histamin, odnosno tiramin koji zatim, u zamjenu za unos pripadne aminokiseline, izlaze iz stanice odgovarajućim antiporterom. Iako ne postoji informacija o inhibitornom djelovanju histamina na aktivnost HisRS, za tiramin je pokazano da djeluje kao kompetitivni inhibitor TyrRS (Santi & Peña, 1971). Stoga, vrlo je vjerojatno da navedene dodatne HisRS i TyrRS djeluju nalik LysU, te održavaju aminoacilacijsku aktivnost uslijed pada pH i prolaznog nakupljanja inhibitornih biogenih amina.



Slika 5 Shematski prikaz rada *cad* sustava i *lysU* u bakteriji *E. coli*. Pri padu ekstracelularne pH vrijednosti transkripcijski regulator CadC potiče ekspresiju operona *cadBA* i gena *lysU*. Skupno djelovanje CadA i CadB izbacuje višak vodikovih iona iz stanice, dok LysU štiti stanicu od inhibitornog djelovanja nastalog kadaverina do njegovog uklanjanja iz stanice. Slika je izrađena prema informacijama u (Brameyer i sur., 2019).

Druga razine kontrole ekspresije *lysU* odvija se preko globalnog transkripcijskog regulatora Lrp (eng. *leucine-responsive regulatory protein*), koju u danom slučaju djeluje kao transkripcijski represor (R. Lin i sur., 1992). To je u skladu s opažanjima da do njegove indukcije dolazi u prisustvu poznatih efektor regulatora Lrp, L-leucina i L-alanina, ali i kasnijim genomskim analizama veznih mjesta za Lrp (Cho i sur., 2008; Clark & Neidhardt, 1990). Kako su L-leucin i L-alanin najčešće aminokiseline u proteinima, smatra se da one služe kao metabolički signal dostupnosti aminokiselina u stanici (Brinkman i sur., 2003). U tom kontekstu ima smisla da uvjeti visoke koncentracije L-leucina signaliziraju „obilje“ i u stanici induciraju ekspresiju *lysU* i porast lizil-tRNA-sintetazne aktivnosti, čime povećavaju stanični kapacitet za sintezu proteina. Ipak, ako je tomu tako, onda je začuđujuća informacija da je *lysU* jedini gen za aaRS u *E. coli* koji je po kontrolom Lrp (Tani i sur., 2002). Kako bi se uloga regulatora Lrp u regulaciji ekspresije *lysU* u potpunosti odgonetnula, potrebna su daljnja istraživanja.

Već je spomenuto kako do indukcije ekspresije *lysU* u uvjetima povišene temperature vjerojatno dolazi zbog njegove veće temperaturne stabilnosti. Međutim, mehanizam kojim se do te indukcije dolazi još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Nasuprot očekivanju, promotorska regija gena *lysU* više nalikuje konsenzusnom veznom mjestu za glavnu staničnu σ -podjedinicu, σ^{70} , nego na alternativnu σ^{32} koja regulira

gene uključene u odgovor na povišenu temperaturu (Clark & Neidhardt, 1990). Nadalje, uočeni porast razine mRNA gena *lysU* znatno je manji od uočenog porasta razine samog proteina LysU, što ukazuje kako se regulacija ekspresije odvija na razini translacije (Ito i sur., 1993). Analizom fuzijskih produkata gena *lysU* Ito i sur. (1993) ustanovili su kako su prva 4 kodona ključna za povećanu stopu translacije, te postulirali da navedeni slijed možebitno sudjeluje u stvaranju kakvih sekundarnih struktura ovisnih o temperaturi. Upravo takav tip regulacije, gdje su ovisno o temperaturi moguće različite sekundarne strukture mRNA, te isključivo pri njenom rastu omogućavaju translaciju vidljiv je i kod gena *rpoH* koji kodira σ^{32} podjedinicu (Yuzawa i sur., 1993). Buduća istraživanja mogla bi potvrditi navedene pretpostavke bioinformatičkom analizom sekundarne strukture *lysU* mRNA i njihovom ciljanom mutagenезom.

Zadnja do danas poznata uloga LysU obuhvaća sintezu diadenozin-tetrafosfata (Ap_4A) i diadenozin-trifosfata (Ap_3A)². Iako njihova uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da Ap_nA sudjeluju kao sekundarni glasnici u stresnoj signalizaciji, te da reguliraju ekspresiju gena u stacionarnoj fazi bakterije *E. coli* sudjelujući u stvaranju 5' kape na mRNA (Ferguson i sur., 2020). *In vitro* usporedba enzimske aktivnosti LysS i LysU je pokazala kako enzim LysU podržava dvostruko veću stopu Ap_nA sintetazne aktivnosti (Brevet i sur., 1995). Daljnja istraživanja uočila su kako u bakterijskim stanicama dolazi do posttranslacijske modifikacije LysU fosforilacijom, koja utječe na njezine kinetičke karakteristike (Wright i sur., 2006). Fosforilacija enzima LysU značajno povećava njegovu stabilnost, te ga čini gotovo 3 puta efikasnijim u sintezi Ap_nA . Uzevši u obzir ekspresijski profil *lysU*, navedeni podatci ukazuju kako LysU kroz sintezu Ap_nA pridonosi staničnom preživljavanju u raznim stresnim uvjetima. Kako i neki drugi enzimi sudjeluju u sintezi Ap_nA (Ferguson i sur., 2020), relativni udio LysU u ukupnoj Ap_nA sintetaznoj aktivnosti stanice mogla bi biti predmet daljnjih istraživanja.

Usprkos dosadašnjim istraživanjima koja su ekstenzivno okarakterizirala strukturu, kinetiku, regulaciju ekspresije i funkcije LysU u bakteriji *E. coli*, još uvijek nedostaju odgovori na neka ključna pitanja: i) Zašto dolazi do indukcije ekspresije *lysU* u prisustvu D-fruktoze i utječu li neki drugi alternativni izvori ugljika na njegovu ekspresiju? ii) Koji je razlog regulacije isključivo LysU, a ne i drugih aaRS, transkripcijskim regulatorom Lrp? iii) Koja je točno priroda regulacije translacije *lysU* mRNA? iv) Koja je uloga LysU u ukupnoj staničnoj sintezi Ap_nA ? Odgovori na ta pitanja pomogli bi razjasniti cjelokupnu ulogu LysU u bakteriji *E. coli*.

² U literaturi pa tako i ovome radu Ap_4A i Ap_3A se skupno nazivaju Ap_nA

8 Zaključak

Osim glavnih staničnih aminoacil-tRNA-sintetaza koje sudjeluju u procesu prijenosa genetičke informacije, bakterije često posjeduju dodatne aaRS koje u stanici obavljaju raznolike uloge. Većina do sada opisanih dodatnih aaRS su dio mehanizma obrane od djelovanja raznih antibiotika i nalaze se u bakterijama koljena *Actinobacteria* i *Bacillota*, uz izražene razlike u genskoj arhitekturi između te dvije skupine. U koljenu *Actinobacteria*, dodatne aaRS koncentrirane su u rodu *Streptomyces*, gdje u pravilu dolaze u sklopu genskih klastera za biosintezu antibiotika. Kao takvi, geni za aaRS pokazali su veliki potencijal kao determinante za otkrivanje i karakterizaciju djelovanja novih biosintetskih klastera i njihovih metabolita. S druge strane bakterije koljena *Bacillota*, većinski iz rodova *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*, u pravilu ne posjeduju biosintetske klastere, te su geni za dodatne aaRS slobodno raspršeni u genomu. Osim obrane od antibiotika, neke dodatne aaRS služe i u njihovoj sintezi, stvarajući donore ogovarajućih aminoacilnih skupina. Dodatne ThrRS i ValRS implicirane su u sporulaciji bakterije *B. subtilis*, no njihova konkretna uloga u tom procesu nije razjašnjena i zahtjeva dodatna istraživanja. Preostale dodatne aaRS svoju ulogu su pronašle u sklopu staničnih odgovora na stres, u vidu obrane od D-aminokiselina, povišene temperature i niskog pH. Posebice je zanimljiv slučaj bakterije *Bacillus subtilis* koja prema današnjim saznanjima u svom genomu posjeduje dodatne gene za čak tri različite aaRS: TrpRS, ThrRS i ValRS.

Mnoge dodatne aaRS posjeduju karakteristike koje bakterijama daju izraženu selektivnu prednost. Iako dane osobine često rezultiraju lošijim kinetičkim karakteristikama *in vitro*, gotovo sve dodatne aaRS *in vivo* podržavaju bakterijski rast jednako uspješno kao i glavne stanične aaRS. Stoga se postavlja pitanje zašto se u bakterijama održavaju dva gena za istu aaRS, ako jedan od njih uz adekvatno ispunjavanje njihove kanonske uloge bakteriji pruža i dodatne kompetitivnu prednost. Moguće je da jednostavno nije prošlo dovoljno vremena za promjenu strogih, često kompleksnih, regulatornih sustava koji kontroliraju ekspresiju dodanih aaRS. U tom kontekstu je moguće da je postojanje konstitutivno ekprimirane TrpRS otporne na djelovanje indolmicina u bakteriji *S. griesus* ATCC 12648 upravo primjer završene prilagodbe regulatornog sustava, te bi njeno daljnje istraživanje moglo razjasniti dinamiku navedenog procesa prilagodbe.

U jeku svih spomenutih otkrića, postojanje dodatne aaRS u genomu za bakterije prestaje biti iznimka i polagano postaje neki oblik pravila. Sukladno s time, daljnja istraživanja trebala bi se okrenuti temeljitoj analizi dosad sekvencioniranih genoma bakterija u potrazi za duplim genima za aaRS. Nadalje, većina opisanih dodatnih aaRS pokazuje vrlo šuru i nepotpunu biokemijsku, filogenetičku i genetičku karakterizaciju, što znatno otežava donošenje kvalitetnih zaključaka o njihovoj ulozi i porijeklu. Stoga su za cjelokupno shvaćanje dodatnih aaRS i njihove uloge u bakterijskom svijetu potrebna daljnja istraživanja u navedenom smjeru.

9 Literatura

- Aliashkevich, A., Alvarez, L., & Cava, F. (2018). New Insights Into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems. *Frontiers in Microbiology*, *9*.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00683>
- Ammerlaan, H. S. M., Kluytmans, J. A. J. W., Wertheim, H. F. L., Nouwen, J. L., & Bonten, M. J. M. (2009). Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: A systematic review. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *48*(7), 922–930. <https://doi.org/10.1086/597291>
- Andam, C. P., & Gogarten, J. P. (2011). Biased gene transfer in microbial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(7), 543–555. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2593>
- Brameyer, S., Rösch, T. C., El Andari, J., Hoyer, E., Schwarz, J., Graumann, P. L., & Jung, K. (2019). DNA-binding directs the localization of a membrane-integrated receptor of the ToxR family. *Communications Biology*, *2*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0248-7>
- Brevet, A., Chen, J., Lévêque, F., Blanquet, S., & Plateau, P. (1995). Comparison of the Enzymatic Properties of the Two *Escherichia coli* Lysyl-tRNA Synthetase Species *. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(24), 14439–14444. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14439>
- Brinkman, A. B., Ettema, T. J. G., De Vos, W. M., & Van Der Oost, J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. *Molecular Microbiology*, *48*(2), 287–294.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03442.x>
- Brown, J. R., Gentry, D., Becker, J. A., Ingraham, K., Holmes, D. J., & Stanhope, M. J. (2003). Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and Gram-positive pathogens. *EMBO Reports*, *4*(7), 692–698. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor881>
- Brown, M. J., Carter, P. S., Fenwick, A. E., Fosberry, A. P., Hamprecht, D. W., Hibbs, M. J., Jarvest, R. L., Mensah, L., Milner, P. H., O'Hanlon, P. J., Pope, A. J., Richardson, C. M., West, A., & Witty, D. R. (2002). The antimicrobial natural product chuangxinmycin and Some synthetic analogues are potent and selective inhibitors of bacterial tryptophanyl tRNA synthetase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *12*(21), 3171–3174. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00604-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00604-2)
- Calendar, R., & Berg, P. (1967). d-Tyrosyl RNA: Formation, hydrolysis and utilization for protein synthesis. *Journal of Molecular Biology*, *26*(1), 39–54. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90259-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90259-8)
- Champney, W. S., & Jensen, R. A. (1969). D-Tyrosine as a Metabolic Inhibitor of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *98*(1), 205–214.

- Champney, W. S., & Jensen, R. A. (1970). Molecular Events in the Growth Inhibition of *Bacillus subtilis* by d-Tyrosine. *Journal of Bacteriology*, *104*(1), 107–116.
- Chang, K.-M., & Hendrickson, T. L. (2009). Recognition of tRNAGln by *Helicobacter pylori* GluRS2—A tRNAGln-specific glutamyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Research*, *37*(20), 6942–6949. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp754>
- Cho, B.-K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S., & Palsson, B. Ø. (2008). Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(49), 19462–19467. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807227105>
- Chuang, R. Y., & Doi, R. H. (1972). Characterization of lysine transfer ribonucleic acid from vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *247*(11), 3476–3484.
- Clark, R. L., & Neidhardt, F. C. (1990). Roles of the two lysyl-tRNA synthetases of *Escherichia coli*: Analysis of nucleotide sequences and mutant behavior. *Journal of Bacteriology*, *172*(6), 3237–3243.
- Coates, T., Bax, R., & Coates, A. (2009). Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: Strengths, weaknesses and future prospects. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(1), 9–15. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp159>
- Cochrane, R. V. K., Sanichar, R., Lambkin, G. R., Reiz, B., Xu, W., Tang, Y., & Vederas, J. C. (2016). Identification and reconstitution of the polyketide synthases responsible for biosynthesis of the anti-malarial agent, cladosporin. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *55*(2), 664–668. <https://doi.org/10.1002/anie.201509345>
- Conant, G. C., & Wolfe, K. H. (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics*, *9*(12), 938–950. <https://doi.org/10.1038/nrg2482>
- Condon, C., Putzer, H., & Grunberg-Manago, M. (1996). Processing of the leader mRNA plays a major role in the induction of thrS expression following threonine starvation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(14), 6992–6997.
- Cookson, B. D. (1998). The emergence of mupirocin resistance: A challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *41*(1), 11–18. <https://doi.org/10.1093/jac/41.1.11>
- Cursino, L., Šmajš, D., Šmarda, J., Nardi, R. m. d., Nicoli, J. r., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. m. a. (2006). Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(4), 821–829. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02834.x>

- Cvetesic, N., Bilus, M., & Gruic-Sovulj, I. (2015). The tRNA A76 Hydroxyl Groups Control Partitioning of the tRNA-dependent Pre- and Post-transfer Editing Pathways in Class I tRNA Synthetase *. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 13981–13991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648568>
- Cvetesic, N., Dulic, M., Bilus, M., Sostaric, N., Lenhard, B., & Gruic-Sovulj, I. (2016). Naturally Occurring Isoleucyl-tRNA Synthetase without tRNA-dependent Pre-transfer Editing*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(16), 8618–8631. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.698225>
- Diaz, M., Del Rio, B., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Martin, M. C., & Alvarez, M. A. (2020). Histamine production in *Lactobacillus vaginalis* improves cell survival at low pH by counteracting the acidification of the cytosol. *International Journal of Food Microbiology*, 321, 108548. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108548>
- do Carmo Ferreira, N., Schuenck, R. P., dos Santos, K. R. N., de Freire Bastos, M. do C., & Giambiagi-deMarval, M. (2011). Diversity of plasmids and transmission of high-level mupirocin mupA resistance gene in *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 61(2), 147–152. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00756.x>
- Du, Y.-L., Alkhalaf, L. M., & Ryan, K. S. (2015). In vitro reconstitution of indolmycin biosynthesis reveals the molecular basis of oxazolinone assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(9), 2717–2722. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419964112>
- Du, Y.-L., Higgins, M. A., Zhao, G., & Ryan, K. S. (2019). Convergent biosynthetic transformations to a bacterial specialized metabolite. *Nature Chemical Biology*, 15(11), 1043–1048. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0331-5>
- Even, S., Pellegrini, O., Zig, L., Labas, V., Vinh, J., Bréchemmier-Baey, D., & Putzer, H. (2005). Ribonucleases J1 and J2: Two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. *Nucleic Acids Research*, 33(7), 2141–2152. <https://doi.org/10.1093/nar/gki505>
- Ferguson, F., McLennan, A. G., Urbaniak, M. D., Jones, N. J., & Copeland, N. A. (2020). Re-evaluation of Diadenosine Tetraphosphate (Ap4A) From a Stress Metabolite to Bona Fide Secondary Messenger. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 606807. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.606807>
- Fukuda, D., Haines, A. S., Song, Z., Murphy, A. C., Hothersall, J., Stephens, E. R., Gurney, R., Cox, R. J., Crosby, J., Willis, C. L., Simpson, T. J., & Thomas, C. M. (2011). A Natural Plasmid Uniquely Encodes Two Biosynthetic Pathways Creating a Potent Anti-MRSA Antibiotic. *PLOS ONE*, 6(3), e18031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018031>

- Garg, R. P., Gonzalez, J. M., & Parry, R. J. (2006). Biochemical Characterization of VlmL, a Seryl-tRNA Synthetase Encoded by the Valanimycin Biosynthetic Gene Cluster *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 26785–26791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603675200>
- Garg, R. P., Ma, Y., Hoyt, J. C., & Parry, R. J. (2002). Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the azoxy antibiotic valanimycin. *Molecular Microbiology*, 46(2), 505–517. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03169.x>
- Gause, G. F. (1955). Recent Studies on Albomycin, a New Antibiotic. *Br Med J*, 2(4949), 1177–1179. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4949.1177>
- Gendron, N., Putzer, H., & Grunberg-Manago, M. (1994). Expression of both *Bacillus subtilis* threonyl-tRNA synthetase genes is autogenously regulated. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 486-494.
- Gentry, D. R., Ingraham, K. A., Stanhope, M. J., Rittenhouse, S., Jarvest, R. L., O’Hanlon, P. J., Brown, J. R., & Holmes, D. J. (2003). Variable Sensitivity to Bacterial Methionyl-tRNA Synthetase Inhibitors Reveals Subpopulations of *Streptococcus pneumoniae* with Two Distinct Methionyl-tRNA Synthetase Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 1784–1789. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.6.1784-1789.2003>
- Glaser, P., Kunst, F., Débarbouillé, M., Vertès, A., Danchin, A., & Dedonder, R. (1991). A gene encoding a tyrosine tRNA synthetase is located near *sacS* in *Bacillus subtilis*. *DNA Sequence: The Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 1(4), 251–261. <https://doi.org/10.3109/10425179109020780>
- Granato, E. T., Meiller-Legrand, T. A., & Foster, K. R. (2019). The Evolution and Ecology of Bacterial Warfare. *Current Biology*, 29(11), R521–R537. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.024>
- Green, L. S., Bullard, J. M., Ribble, W., Dean, F., Ayers, D. F., Ochsner, U. A., Janjic, N., & Jarvis, T. C. (2009). Inhibition of Methionyl-tRNA Synthetase by REP8839 and Effects of Resistance Mutations on Enzyme Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 86–94. <https://doi.org/10.1128/AAC.00275-08>
- Grundy, F. J., & Henkin, T. M. (1993). tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell*, 74(3), 475–482. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80049-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80049-K)
- Gutiérrez-Preciado, A., Henkin, T. M., Grundy, F. J., Yanofsky, C., & Merino, E. (2009). Biochemical Features and Functional Implications of the RNA-Based T-Box Regulatory Mechanism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 73(1), 36–61. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-08>
- Haneburger, I., Eichinger, A., Skerra, A., & Jung, K. (2011). New Insights into the Signaling Mechanism of the pH-responsive, Membrane-integrated Transcriptional Activator CadC of *Escherichia coli*.

- The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10681–10689.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196923>
- Harbarth, S., Dharan, S., Liassine, N., Herrault, P., Auckenthaler, R., & Pittet, D. (1999). Randomized, placebo-controlled, double-blind trial to evaluate the efficacy of mupirocin for eradicating carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1412–1416. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1412>
- Henkin, T. M., Glass, B. L., & Grundy, F. J. (1992). Analysis of the *Bacillus subtilis* tyrS gene: Conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes. *Journal of Bacteriology*, 174(4), 1299–1306.
- Hirshfield, I. N., Terzulli, S., & O’Byrne, C. (2003). Weak organic acids: A panoply of effects on bacteria. *Science Progress*, 86(Pt 4), 245–269. <https://doi.org/10.3184/003685003783238626>
- Hu, Z., Awakawa, T., Ma, Z., & Abe, I. (2019). Aminoacyl sulfonamide assembly in SB-203208 biosynthesis. *Nature Communications*, 10(1), 184. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08093-x>
- Hughes, C. A., Gorabi, V., Escamilla, Y., Dean, F. B., & Bullard, J. M. (2020). Two Forms of Tyrosyl-tRNA Synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization and Discovery of Inhibitory Compounds. *SLAS Discovery: Advancing Life Sciences R & D*, 25(9), 1072–1086. <https://doi.org/10.1177/2472555220934793>
- Hughes, J., & Mellows, G. (1980). Interaction of pseudomonic acid A with *Escherichia coli* B isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemical Journal*, 191(1), 209–219. <https://doi.org/10.1042/bj1910209>
- Hurdle, J. G., O’Neill, A. J., & Chopra, I. (2004). Anti-staphylococcal activity of indolmycin, a potential topical agent for control of staphylococcal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 549–552. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh352>
- Hurdle, J. G., O’Neill, A. J., & Chopra, I. (2005). Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 4821–4833. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.4821-4833.2005>
- Ito, K., Kawakami, K., & Nakamura, Y. (1993). Multiple control of *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase expression involves a transcriptional repressor and a translational enhancer element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(1), 302–306. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.302>
- Kanamaru, T., Nakano, Y., Toyoda, Y., Miyagawa, K.-I., Tada, M., Kaisho, T., & Nakao, M. (2001). In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of TAK-083, an Agent for Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2455–2459. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2455-2459.2001>

- Kerr, A., & Bullard, G. (2020). Biocontrol of Crown Gall by *Rhizobium rhizogenes*: Challenges in Biopesticide Commercialisation. *Agronomy*, *10*(8), 1126.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10081126>
- Kitabatake, M., Ali, K., Demain, A., Sakamoto, K., Yokoyama, S., & Söll, D. (2002). Indolmycin Resistance of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Induced Expression of One of Its Two Tryptophanyl-tRNA Synthetases*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(26), 23882–23887.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M202639200>
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., & Losick, R. (2010). D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5978), 627–629.
<https://doi.org/10.1126/science.1188628>
- Küper, C., & Jung, K. (2005). CadC-Mediated Activation of the cadBA Promoter in *Escherichia coli*. *Microbial Physiology*, *10*(1), 26–39. <https://doi.org/10.1159/000090346>
- Lam, H., Oh, D.-C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., de Pedro, M. A., & Waldor, M. K. (2009). D-amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Re-Modeling in Bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *325*(5947), 1552–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1178123>
- Leiman, S. A., May, J. M., Lebar, M. D., Kahne, D., Kolter, R., & Losick, R. (2013). D-Amino Acids Indirectly Inhibit Biofilm Formation in *Bacillus subtilis* by Interfering with Protein Synthesis. *Journal of Bacteriology*, *195*(23), 5391–5395. <https://doi.org/10.1128/JB.00975-13>
- Leiman, S. A., Richardson, C., Foulston, L., Elsholz, A. K. W., First, E. A., & Losick, R. (2015). Identification and Characterization of Mutations Conferring Resistance to d-Amino Acids in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *197*(9), 1632–1639. <https://doi.org/10.1128/JB.00009-15>
- Lévêque, F., Gazeau, M., Fromant, M., Blanquet, S., & Plateau, P. (1991). Control of *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase expression by anaerobiosis. *Journal of Bacteriology*, *173*(24), 7903–7910.
- Lin, R., Ernstring, B., Hirshfield, I. N., Matthews, R. G., Neidhardt, F. C., Clark, R. L., & Newman, E. B. (1992). The lrp gene product regulates expression of lysU in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *174*(9), 2779–2784.
- Lin, Z., Xu, X., Zhao, S., Yang, X., Guo, J., Zhang, Q., Jing, C., Chen, S., & He, Y. (2018). Total synthesis and antimicrobial evaluation of natural albomycins against clinical pathogens. *Nature Communications*, *9*(1), 3445. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05821-1>
- Linares, D. M., Fernández, M., Del-Río, B., Ladero, V., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2012). The tyrosyl-tRNA synthetase like gene located in the tyramine biosynthesis cluster of *Enterococcus durans* transcriptionally regulated by tyrosine concentration and extracellular pH. *BMC Microbiology*, *12*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-23>

- Long, M., VanKuren, N. W., Chen, S., & Vibranovski, M. D. (2013). New Gene Evolution: Little Did We Know. *Annual review of genetics*, 47, 307–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133301>
- Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., Fernández, E. N., Bover-Cid, S., Hall, R., Sauer, M., & O’Byrne, C. (2020). Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.556140>
- Luo, D., Leautey, J., Grunberg-Manago, M., & Putzer, H. (1997). Structure and regulation of expression of the *Bacillus subtilis* valyl-tRNA synthetase gene. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2472–2478.
- Martín, M. C., Fernández, M., Linares, D. M., & Alvarez, M. A. (2005). Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 4), 1219–1228. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27459-0>
- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., Krashennnikov, I., Kolb, V., Khmel, I., & Severinov, K. (2006). Aspartyl-tRNA Synthetase Is the Target of Peptide Nucleotide Antibiotic Microcin C*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 18033-18042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513174200>
- Moutiez, M., Belin, P., & Gondry, M. (2017). Aminoacyl-tRNA-Utilizing Enzymes in Natural Product Biosynthesis. *Chemical Reviews*, 117(8), 5578–5618. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00523>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2012). *Lehninger Principles of Biochemistry* (Sixth edition). W.H. Freeman.
- Ohyama, K., Kaneko, I., & Ohkuma, S. (1984). Correlation between two active forms of valyl-trna synthetase and aminoacylation levels of two valine isoaccepting trna species in the early stages of sporulation of *bacillus subtilis*. *Microbiology and Immunology*, 28(11), 1257–1260. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1984.tb00782.x>
- Ohyama, K., Kaneko, I., Yamakawa, T., & Ohkuma, S. (1983). Two active forms of valyl-tRNA synthetase from *Bacillus subtilis*: Alteration related to the early stages of sporulation. *Microbiology and Immunology*, 27(7), 565–574. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1983.tb00617.x>
- Ohyama, K., Kaneko, I., Yamakawa, T., & Watanabe, T. (1977). Alteration in two enzymatically active forms of valyl-tRNA synthetase during the sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry*, 81(5), 1571–1574.
- Olano, C., Wilkinson, B., Sánchez, C., Moss, S. J., Sheridan, R., Math, V., Weston, A. J., Braña, A. F., Martín, C. J., Oliynyk, M., Méndez, C., Leadlay, P. F., & Salas, J. A. (2004). Biosynthesis of the

- angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055: Cluster analysis and assignment of functions. *Chemistry & Biology*, *11*(1), 87–97.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.12.018>
- Oliveira, N. E. M. de, Cavalcanti, E. D. C., Laport, M. S., Bastos, M. do C. de F., & Giambiagi-deMarval, M. (2009). Constitutive expression of the ileS-2 gene responsible for high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, *58*(12), 1582–1584.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.013912-0>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, *16*(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Perona, J. J., & Grujić-Sovulj, I. (2014). Synthetic and Editing Mechanisms of Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Topics in Current Chemistry*, *344*, 1–42. https://doi.org/10.1007/128_2013_456
- Perona, J. J., & Hadd, A. (2012). Structural Diversity and Protein Engineering of the Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Biochemistry*, *51*(44), 8705–8729. <https://doi.org/10.1021/bi301180x>
- Poovelikunnel, T., Gethin, G., & Humphreys, H. (2015). Mupirocin resistance: Clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(10), 2681–2692. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv169>
- Putzer, H., Brakhage, A. A., & Grunberg-Manago, M. (1990). Independent genes for two threonyl-tRNA synthetases in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *172*(8), 4593–4602.
- Putzer, H., Gendron, N., & Grunberg-Manago, M. (1992). Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: Control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *The EMBO Journal*, *11*(8), 3117–3127.
- Reader, J. S., Ordoukhanian, P. T., Kim, J.-G., de Crécy-Lagard, V., Hwang, I., Farrand, S., & Schimmel, P. (2005). Major Biocontrol of Plant Tumors Targets tRNA Synthetase. *Science*, *309*(5740), 1533–1533. <https://doi.org/10.1126/science.1116841>
- Renault, P., Godon, J. J., Goupil, N., Delorme, C., Corthier, G., & Ehrlich, S. D. (1995). Metabolic operons in Lactococci. *Developments in Biological Standardization*, *85*, 431–441.
- Ruan, B., Bovee, M. L., Sacher, M., Stathopoulos, C., Poralla, K., Francklyn, C. S., & Söll, D. (2005). A Unique Hydrophobic Cluster Near the Active Site Contributes to Differences in Borrelidin Inhibition among Threonyl-tRNA Synthetases *. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 571–577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411039200>
- Santi, D. V., & Peña, V. A. (1971). Order of substrate binding to tyrosyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* B. *FEBS Letters*, *13*(3), 157–160. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80224-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80224-7)

- Shi, Y., Jiang, Z., Li, X., Zuo, L., Lei, X., Yu, L., Wu, L., Jiang, J., & Hong, B. (2018). Biosynthesis of antibiotic chuangxinmycin from *Actinoplanes tsinanensis*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.07.005>
- Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Kodama, K., & Takahashi, S. (1993). Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *The Journal of Antibiotics*, 46(12), 1834–1842. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1834>
- Soutourina, J., Plateau, P., & Blanquet, S. (2000). Metabolism of d-Aminoacyl-tRNAs in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32535–32542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005166200>
- Stefanska, A. L., Cassels, R., Ready, S. J., & Warr, S. R. (2000). SB-203207 and SB-203208, Two Novel Isoleucyl tRNA Synthetase Inhibitors from a *Streptomyces* sp. I. Fermentation, Isolation and Properties. *The Journal of Antibiotics*, 53(4), 357–363. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.357>
- Tani, T. H., Khodursky, A., Blumenthal, R. M., Brown, P. O., & Matthews, R. G. (2002). Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13471–13476. <https://doi.org/10.1073/pnas.212510999>
- Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I., & Jung, K. (2008). The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Molecular Microbiology*, 67(3), 570–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06070.x>
- Theoclitou, M.-E., Wittung, E. P. L., Hindley, A. D., El-Thaher, T. S. H., & Miller, A. D. (1996). Characterisation of stress protein LysU. Enzymic synthesis of diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A) analogues by LysU. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 16, 2009–2019. <https://doi.org/10.1039/P19960002009>
- Ushimaru, R., Chen, Z., Zhao, H., Fan, P., & Liu, H. (2020). Identification of the Enzymes Mediating the Maturation of the Seryl-tRNA Synthetase Inhibitor SB-217452 during the Biosynthesis of Albomycins. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(9), 3558–3562. <https://doi.org/10.1002/anie.201915275>
- Vecchione, J. J., & Sello, J. K. (2008). Characterization of an Inducible, Antibiotic-Resistant Aminoacyl-tRNA Synthetase Gene in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 190(18), 6253–6257. <https://doi.org/10.1128/JB.00737-08>
- Vecchione, J. J., & Sello, J. K. (2009). A Novel Tryptophanyl-tRNA Synthetase Gene Confers High-Level Resistance to Indolmycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3972–3980. <https://doi.org/10.1128/AAC.00723-09>

- Vecchione, J. J., & Sello, J. K. (2010). Regulation of an Auxiliary, Antibiotic-Resistant Tryptophanyl-tRNA Synthetase Gene via Ribosome-Mediated Transcriptional Attenuation. *Journal of Bacteriology*, *192*(14), 3565–3573. <https://doi.org/10.1128/JB.00290-10>
- Wang, X., Wedge, D. E., & Cutler, S. J. (2016). Chemical and Biological Study of Cladosporin, an Antimicrobial Inhibitor: A Review. *Natural Product Communications*, *11*(10), 1934578X1601101039. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101039>
- Williams-Wagner, R. N., Grundy, F. J., Raina, M., Ibbra, M., & Henkin, T. M. (2015). The *Bacillus subtilis* tyrZ Gene Encodes a Highly Selective Tyrosyl-tRNA Synthetase and Is Regulated by a MarR Regulator and T Box Riboswitch. *Journal of Bacteriology*, *197*(9), 1624–1631. <https://doi.org/10.1128/JB.00008-15>
- Woese, C. R., Olsen, G. J., Ibbra, M., & Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA Synthetases, the Genetic Code, and the Evolutionary Process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(1), 202–236.
- Wolf, Y. I., Aravind, L., Grishin, N. V., & Koonin, E. V. (1999). Evolution of Aminoacyl-tRNA Synthetases—Analysis of Unique Domain Architectures and Phylogenetic Trees Reveals a Complex History of Horizontal Gene Transfer Events. *Genome Research*, *9*(8), 689–710. <https://doi.org/10.1101/gr.9.8.689>
- Wright, M., Boonyalai, N., Tanner, J. A., Hindley, A. D., & Miller, A. D. (2006). The duality of LysU, a catalyst for both Ap4A and Ap3A formation. *The FEBS Journal*, *273*(15), 3534–3544. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05361.x>
- Yamato, M., Iinuma, H., Naganawa, H., Yamagishi, Y., Hamada, M., Masuda, T., Umezawa, H., Abe, V., & Hori, M. (1986). Isolation and properties of valanimycin, a new azoxy antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, *39*(2), 184–191. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.184>
- Yanagisawa, T., & Kawakami, M. (2003). How Does *Pseudomonas fluorescens* Avoid Suicide from Its Antibiotic Pseudomonic Acid?: EVIDENCE FOR TWO EVOLUTIONARILY DISTINCT ISOLEUCYL-tRNA SYNTHETASES CONFERRING SELF-DEFENSE*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(28), 25887–25894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302633200>
- Y. Travin, D., Severinov, K., & Dubiley, S. (2021). Natural Trojan horse inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases. *RSC Chemical Biology*, *2*(2), 468–485. <https://doi.org/10.1039/D0CB00208A>
- Yuzawa, H., Nagai, H., Mori, H., & Yura, T. (1993). Heat induction of sigma 32 synthesis mediated by mRNA secondary structure: A primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *21*(23), 5449–5455.
- Zanki, V., Bozic, B., Mocibob, M., Ban, N., & Gruic-Sovulj, I. (2022). A pair of isoleucyl-tRNA synthetases in *Bacilli* fulfills complementary roles to keep fast translation and provide antibiotic resistance. *Protein Science*, *31*(9), e4418. <https://doi.org/10.1002/pro.4418>

Zeng, Y., Roy, H., Patil, P. B., Ibba, M., & Chen, S. (2009). Characterization of Two Seryl-tRNA Synthetases in Albomycin-Producing *Streptomyces* sp. Strain ATCC 700974. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4619–4627. <https://doi.org/10.1128/AAC.00782-09>