

# Komparativna analiza fosfoproteoma sojeva bakterije *S. rimosus* koji proizvode oksitetraciklin

---

Šarić, Ela

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:263138>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-12**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

ELA ŠARIĆ

**Komparativna analiza fosfoproteoma  
sojeva bakterije *S. rimosus* koji proizvode  
oksitetraciklin**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

ELA ŠARIĆ

**Komparativna analiza fosfoproteoma  
sojeva bakterije *S. rimosus* koji proizvode  
oksitetraciklin**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

dr. sc. Dušica Vujaklija, znanstvena savjetnica

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

ELA ŠARIĆ

**Comparative phosphoproteome analysis  
of *Streptomyces rimosus* oxytetracycline  
producers strains**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

dr. sc. Dušica Vujaklija, Senior Scientist

Zagreb, 2022.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O MENTORICI

Dr.sc Dušica Vujaklija (<http://www.irb.hr/Ljudi/Dusica-Vujaklija>) diplomirala je 1982. na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biokemijsko inženjerstvo. Doktorsku radnju obranila je na Sveučilištu u Tokiju 1992., a po povratku iz Japana zaposlila se na Institutu Ruđer Bošković i od tada svoja znanstvena napredovanja provodi u području prirodnih znanosti, znanstvena grana molekularna biologija i biokemija. Poslijedoktorsko usavršavanje od 1993.-1995. provela je na Sveučilištu British Columbia u Kanadi gdje je zatim redovito odlazila na višemjesečne studijske boravke. Od samih početaka znanstvene karijere njezina istraživanja usmjerena su uglavnom na proučavanje signalnih puteva i regulatornih mehanizama uključenih u različite stanične procese metabolizma DNA i regulaciju biosinteze antibiotika bakterija roda *Streptomyces*. Tijekom svojih istraživanja odlazila je na poziv kao gostujući znanstvenik u brojne znanstvene centre te je ostvarila niz međunarodnih suradnji s renomiranim znanstvenicima, kao što su: J. Davies, Sveučilište British Columbia, B. Maček, Proteome Center Tuebingen, R. Duran, Sveučilište Pau, I. Hunter i P. Herron, Sveučilište Strathclyde, D. Jakimowicz, Sveučilište Wroclaw i drugi. Ove suradnje omogućile su joj uvođenje propulzivnih znanstvenih problematika u matičnoj ustanovi. Zadnjih par godina intenzivno istražuje nove streptomicetne vrste te njihov potencijal za sintezu medicinski i biotehnološki važnih metabolita u odabranim morskim nišama.

Do sada je uspješno vodila 10 projekata (HrZZ, UKF, MZOŠ, ADRIS, te 6 bilateralnih projekata), a u tijeku je vođenje Aktivnosti 1, EU projekta - Fonda za regionalni razvoj (KK.01.1.1.01). Objavila je 34 znanstvena rada, od toga većinu u iznadprosječnim časopisima. Cjelovita bibliografija dostupna je na: <http://bib.irb.hr/lista-radova?autor=116760>. Tijekom zadnja dva desetljeća održala je preko 40 pozvanih predavanja. Dobitnica je nekoliko nagrada za svoje znanstvene radove: 2020. Zaklade prof. dr. sc Branimir Jernej; 2020. Zavoda za Fizičku kemiju, te Nagrade IRB-a za najbolji znanstveni rad u području (2013. i 2020.), a 2020. za doprinos razvoja mikrobiologije dobila je i Plaketu Hrvatskog mikrobiološkog društva.

Od ostalih važnih akademskih postignuća treba istaknuti da je Dušica Vujaklija i osnivač renomirane međunarodne ljetne škole: "Summer Schools in Applied Molecular Microbiology (SSAMM)" koja se održava od 2007. godine. Također od 1999. aktivno sudjeluje u nastavi pri različitim fakultetima Sveučilišta u Zagrebu. Aktivna je članica različitih strukovnih udruga, a od 2021. je predsjednica Hrvatskog genetičkog društva, dok je od 2012.-2020. bila predsjednica Bakteriološke sekcije Hrvatskog mikrobiološkog društva. Sudjeluje je i na brojnim događanjima za popularizaciju znanosti.

**Komparativna analiza fosfoproteoma sojeva bakterije *Streptomyces rimosus* koji proizvode oksitetraciklin**

ELA ŠARIĆ

Laboratorij za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku, Zavod za fizičku kemiju,  
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, Zagreb 10 000

Streptomiceti su višestanične bakterije složenog životnog ciklusa. Najpoznatije su po genetičkom potencijalu za sintezu antibiotika širokog spektra u koje spadaju i tetraciklini od izuzetnog komercijalnog značaja. Već desetljećima se bakterija *Streptomyces rimosus* koristi za proizvodnju oksitetraciklina (OTC) čija godišnja potrošnja prelazi  $10^8$  kg. Biosinteza antibiotika je kontrolirana kompleksnim signalnim putevima koji uključuju i fosforilacije proteina. Kako bi rasvijetlili regulatorne mehanizme uključene u procese odgovorne za rast i sintezu OTC-a u ovoj doktorskoj radnji je primjenom spektrometrije masa po prvi put istražen (fosfo)proteom bakterije *S. rimosus* G7 i visokog proizvođača OTC-a (soj 23383). Određena je dinamika sinteze (fosfo)proteina tijekom rasta ovih bakterija, a ostvareni rezultati su korelirani s procesima uključenim u biosintezu antibiotika i staničnu diferencijaciju. Identificirano je 4053 proteina (~50% proteoma) te 433 fosfoproteina od kojih je 203 fosfoproteina pronađeno samo kod soja 23383. Funkcionalna karakterizacija i analiza dinamike fosforilacije ovih proteina dali su posve novi uvid u fosfoproteom streptomiceta općenito. Identificirana je do sada neopisana posttranslacijska modifikacija niza proteina koji su važni za staničnu diobu i metabolizam te sintezu antibiotika i odgovor na stres.

(183 stranica / 37 slika / 26 tablica / 135 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: bakterija *Streptomyces rimosus*, proteom, fosfoproteom, oksitetraciklin

Mentor: dr. sc. Dušica Vujaklija, znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: dr. sc. Ksenija Zahradka, viša znanstvena suradnica

dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

dr. sc. Saša Kazazić, viši znanstveni suradnik

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**Comparative phosphoproteome analysis of *Streptomyces rimosus* oxytetracycline producers strains**

ELA ŠARIĆ

Laboratory for mass spectrometry and functional proteomics, Division of Physical Chemistry,  
Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, Zagreb 10 000

Streptomycetes are multicellular bacteria with a complex life cycle. They are best known for their great potential for the synthesis of broad-spectrum antibiotics, which include tetracyclines of significant commercial importance. For decades, *Streptomyces rimosus* has been used to produce oxytetracycline (OTC) whose annual consumption exceeds 10<sup>8</sup> kg. Antibiotic biosynthesis is controlled by complex signaling pathways that include protein phosphorylation. In order to elucidate the regulatory mechanisms involved in the processes responsible for bacterial growth and OTC synthesis, the (phospho)proteome of *S. rimosus* G7 and a high OTC producer (strain 23383) was investigated for the first time using mass spectrometry in this doctoral dissertation. The dynamics of (phospho)proteomes during the growth of these bacteria was determined and results were correlated with the processes involved in antibiotic biosynthesis and cell differentiation. In total, 4053 proteins (~ 50% of proteomes) and 433 phosphoproteins were identified, of which 203 phosphoproteins were found only in strain 23383. Functional characterization and analysis of phosphorylation dynamics of these proteins gave a completely new insight into streptomycete phosphoproteins in general. So far undescribed posttranslational modification of a number of proteins important for cell division and metabolism, as well as antibiotic synthesis and stress response, has been identified.

(183 pages / 37 figures / 26 tables / 135 references / original in Croatian)

Keywords: *Streptomyces rimosus*, proteome, phosphoproteome, oxytetracycline

Supervisor: Dr. sc. Dušica Vujaklija, Senior Scientist

Reviewers: Dr. sc. Ksenija Zahradka, Senior Research Associate

Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor

Dr. sc. Saša Kazazić, Senior Research Associate





## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	5
2.1. Streptomiceti – najbrojniji rod aktinobakterija .....	5
2.1.1. Opće karakteristike streptomiceta i aktinobakterija.....	5
2.1.2. Životni ciklus streptomiceta.....	6
2.1.3. Opće karakteristike genoma streptomiceta .....	8
2.1.4. Bakterija <i>Streptomyces rimosus</i> .....	11
2.2. Biosinteza sekundarnih metabolita kod streptomiceta .....	12
2.2.1. Sekundarni metabolizam streptomiceta .....	12
2.2.2. Tetraciklini .....	13
2.2.3. Oksitetraciklin.....	14
2.2.4. Regulacija biosinteze antibiotika u streptomicetima .....	16
2.3. Post-translacijske modifikacije .....	19
2.3.1. Fosforilacija proteina .....	20
2.3.2. Bakterijske proteinske kinaze .....	22
2.3.3. Istraživanja fosfoproteoma kod bakterija.....	26
2.3.4. Istraživanja uloge fosforilacije proteina kod bakterija.....	27
3. MATERIJALI I METODE.....	30
3.1. Materijali .....	30
3.1.1. Osnovne kemikalije .....	30
3.1.2. Materijali.....	31
3.1.3. Otopine i puferi .....	32
3.1.4. Molekularni biljezi.....	33
3.1.5. Enzimi .....	34
3.1.6. Antitijela .....	34
3.1.7. Uređaji.....	34
3.2. Mikroorganizmi.....	35
3.3. Metode.....	36
3.3.1. Uzgoj mikroorganizama.....	36
3.3.2. Mjerenje suhe biomase .....	37
3.3.3. Sakupljanje i liza stanica.....	37
3.3.4. Taloženje proteina pomoću metanola i kloroforma .....	38

3.3.5. Određivanje koncentracije proteina.....	38
3.3.6. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima SDS-PAGE.....	39
3.3.7. Western blot.....	39
3.3.8. Testiranje aktivnosti i koncentracije antibiotika.....	40
3.3.9. Razgradnja proteina na peptide u otopini.....	41
3.3.10. Priprema tzv. <i>StageTip</i> -ova i pročišćavanje peptida.....	42
3.3.11. Pročišćavanje proteina na grafitnoj koloni.....	42
3.3.12. Dimetilno obilježavanje proteina stabilnim izotopima (engl. <i>stable-isotope dimethyl labelling</i> ).....	43
3.3.13. Provjera ugradnje stabilnih izotopa i miješanja uzoraka.....	44
3.3.14. Obogaćivanje fosfopeptidima.....	45
3.3.15. Mjerenja LC-MS/MS.....	45
3.3.16. Analiza neobrađenih podataka.....	46
3.3.17. Statističke analize.....	47
3.3.18. Odabir metode za analizu (fosfo)proteoma bakterije <i>S. rimosus</i> .....	47
3.3.19. Funkcionalna anotacija i analiza funkcionalnog obogaćivanja.....	48
4. REZULTATI.....	50
4.1. Morfološke specifičnosti i sposobnost sinteze OTC-a sojeva bakterije <i>S. rimosus</i> dostupnih u laboratorijskoj kolekciji.....	50
4.1.1. Rast bakterija na krutom mediju i morfološke specifičnosti.....	50
4.1.2 Rast bakterija u tekućem mediju.....	51
4.1.3 Sinteza OTC-a.....	52
4.1.4 Detekcija dinamike fosforilacije pomoću metode Western blot.....	53
4.1.5. Odabir sojeva i točaka prikupljanja biomase za identifikaciju (fosfo)proteoma....	56
4.2. Kvalitativna analiza proteoma i fosfoproteoma bakterije <i>S. rimosus</i> , sojeva G7 i 23383	58
4.2.1 Kvalitativna analiza proteoma soja G7.....	58
4.2.2 Kvalitativna analiza fosfoproteoma soja G7.....	59
4.2.3 Kvalitativna analiza proteoma soja 23383.....	59
4.2.4 Kvalitativna analiza fosfoproteoma soja 23383.....	60
4.3. Kvantitativna analiza proteoma i fosfoproteoma bakterije <i>S. rimosus</i> , sojeva G7 i 23383 u različitim fazama rasta.....	61
4.3.1. Kvantitativna analiza proteoma soja G7.....	61
4.3.2. Kvantitativna analiza fosfoproteoma soja G7.....	65
4.3.3. Kvantitativna analiza proteoma soja 23383.....	68
4.3.4. Kvantitativna analiza fosfoproteoma soja 23383.....	72

4.4. Usporedba proteoma i fosfoproteoma bakterije <i>S. rimosus</i> , sojeva G7 i 23383 .....	74
4.4.1. Primarni metabolizam.....	76
4.4.2. Stanični ciklus i dioba.....	76
4.4.3. Sekundarni metabolizam .....	77
4.4.4. Stanični odgovor na stres.....	79
4.4.5. Regulatorni proteini .....	82
4.4.6. Proteini nepoznate funkcije .....	85
4.5. Usporedba fosfoproteoma bakterija <i>S. rimosus</i> i <i>S. coelicolor</i> .....	86
5. DISKUSIJA .....	88
5.1. Profili (fosfo)proteoma analizirani su u specifičnim i strogo kontroliranim fazama rasta .....	88
5.2. Uočene specifičnosti (fosfo)proteoma sojeva G7 i 23383 .....	89
5.3. Dinamika sinteze i fosforilacije proteina kod sojeva G7 i 23383 .....	91
5.3.1. Soj G7 .....	91
5.3.2. Soj 23383 .....	95
5.4. Komparativna analiza.....	98
6. ZAKLJUČCI.....	102
7. LITERATURA .....	103
8. PRILOZI.....	113
9. POPIS KRATICA.....	182
10. ŽIVOTOPIS .....	184

## 1. UVOD

Streptomiceti (lat. *Streptomyces*) su Gram-pozitivne, višestanične aktinobakterije, koje su obilno prisutne u tlu, ali nastanjuju i druge okoliše, uključujući morske i slatkovodne ekosustave. Po svojim karakteristikama kolonije streptomiceta jako nalikuju plijesnima jer tijekom rasta stvaraju hife koje tvore filamentozni micelij. Tijekom svog životnog ciklusa, streptomiceti prolaze kroz kompleksnu morfološku diferencijaciju koja uključuje nekoliko razvojnih stadija. Morfološka diferencijacija započinje germinacijom spora koje u povoljnim uvjetima počinju klijanje pri čemu nastaju hife koje se granaju i poprečno pregrađuju polupropusnim septama tako da se u pojedinim odjeljcima nalazi više kopija kromosoma. Na krutoj podlozi, hife urastaju u podlogu tvoreći vegetativni (supstratni) micelij. U uvjetima stresa, kao što je nedostatak hrane, iz vegetativnog micelija započinje rast zračnog micelija. Pregrađivanjem zračnih hifa nastaju septe i odjeljci samo s jednom kopijom kromosoma, a iz ovakvih sporogenih odjeljaka nastaju zrele spore<sup>1</sup>. Tijekom morfološke diferencijacije streptomiceti prolaze i kroz fiziološku diferencijaciju te uz primarni metabolizam u kasnijoj fazi rasta ove bakterije sintetiziraju cijeli niz sekundarnih odnosno specijaliziranih metabolita. Naime, ove bakterije su poznate po svom velikom genetskom potencijalu za proizvodnju antibiotika, lijekova protiv raka, imunomodulatora i drugih bioaktivnih spojeva od značajne medicinske i industrijske vrijednosti<sup>2,3,4</sup>. Vrste ovog roda sintetiziraju oko dvije trećine klinički važnih antibiotika koji su u trenutnoj uporabi. U ovu skupinu spojeva svakako spadaju i tetraciklini, antibiotici širokog spektra koji uz veliki medicinski imaju i izuzetan komercijalan značaj<sup>5</sup>.

Genomi bakterija iz roda *Streptomyces* su izuzetno veliki, obično od 6 do 12 Mb s prosječno preko 7000 kodirajućih gena smještenih duž linearnog kromosoma<sup>6,7</sup>. Najproučavanija vrsta roda *Streptomyces* je modelna bakterija *Streptomyces coelicolor* A3(2). Sekvenciranje genoma ove bakterije pokazalo je da ima izuzetno veliki linearni kromosom veličine 8,66 Mpb s 7825 predviđenih gena, te da uz poznate genske klasterne za biosintezu antibiotika, poput aktinorodina, ova bakterija ima oko 20 genskih klastera za biosintezu do sada neopisanih sekundarnih metabolita<sup>8</sup>. Ovako veliki genomi streptomiceta odraz su njihovih ne samo složenih razvojnih ciklusa, već pokazuju i njihov potencijal prilagodbe različitim ekološkim nišama kao i genetički zapis za proizvodnju širokog spektra antibiotika i drugih bioaktivnih metabolita. U skladu s tim, velik dio njihovih gena ima regulatornu ulogu čija je funkcija

koordiniranje složene morfološke i fiziološke diferencijacije<sup>9</sup>. Za *S. coelicolor* je procijenjeno da više od 900 gena (~12% ukupnih gena) ima regulatornu ulogu<sup>8</sup>.

U svim domenama života, pa tako i kod streptomiceta, fosforilacija proteina ima ključnu regulatornu ulogu u gotovo svim staničnim procesima<sup>10</sup>. Fosforilacijom staničnih proteina brzo se prenose stanični signali (signalne kaskade) kojima bakterijske stanice odgovaraju na promijenjene uvjete rasta te brzo mijenjaju razinu ili potiču ekspresiju brojnih gena. Tako se kontroliraju različiti procesi koji sudjeluju u staničnom rastu, diferencijaciji stanica, sintezi novih metabolita ili odzivu na stres. Fosforilacija je reverzibilna posttranslacijska modifikacija proteina (PTM) koja promjenom strukturne konformacije proteina regulira njegovu biološku funkciju. Kao i u drugim bakterijama, dvokomponentni sustavi za prijenos signala (TCS) koji se sastoje od histidin kinaze i odgovarajućeg proteina regulatora najbrojniji su na genomima streptomiceta<sup>11</sup>. Nasuprot tome, protein kinaze koje fosforiliraju serinske, treoninske i tirozinske aminokiselinske ostatke (kinaze STYK) su prvi put identificirane kod eukariota<sup>12</sup>. Međutim, s vremenom je utvrđeno da su ovi enzimi široko rasprostranjeni i kod bakterija i arheja. Štoviše, kod bakterija je sada poznato da ovaj tip kinaza sudjeluje u brojnim i ključnim staničnim procesima, od staničnog i DNA metabolizma, do staničnog rasta i diobe pa i virulencije<sup>10,13</sup>. Razvoj naprednih analitičkih analiza doveo je tijekom zadnjih desetljeća do ekspanzije istraživanja fosfoproteoma u različitim prokariotskim sustavima<sup>14,15</sup>. Tehnološki napredak i nove tehnike temeljene na spektrometriji masa omogućile su identifikaciju brojnih mjesta fosforilacije u jednom eksperimentu<sup>16</sup>. Posljedično, to je rezultiralo značajnim povećanjem baza podataka fosforiliranih proteina kod prokariota<sup>17</sup>, što sada predstavlja ozbiljan izazov u razumijevanju biološke važnosti brojnih identificiranih događaja fosforilacije. Prvi fosfoproteomi sa specifičnim mjestima fosforilacije su prijavljeni za dvije modelne bakterije, *Bacillus subtilis*<sup>18</sup> i *Escherichia coli*<sup>19</sup>. Od tada su istraživanja uglavnom usmjerena na patogene vrste<sup>20</sup>. U kontekstu industrijski važnih bakterija zabilježeno je samo nekoliko objavljenih fosfoproteoma, npr. bakterije *Corynebacterium glutamicum* koja se koristi za proizvodnju glutamata<sup>21</sup>, bakterije *Lactococcus lactis*, koja se koristi u prehrambenoj industriji<sup>22</sup> i aktinobakterije *Saccharopolyspora erythraea*, koja proizvodi eritromicin<sup>23</sup>.

Što se tiče bakterija roda *Streptomyces*, analize fosfoproteoma su, do ove studije, provedene samo za modelni organizam, *S. coelicolor* koji se ne koristi za komercijalnu proizvodnju antibiotika. Prva globalna studija fosfoproteoma *S. coelicolor* izvijestila je o 46 novih mjesta fosforilacije na 40 proteina identificiranih tijekom rasta bakterije u tekućoj kulturi<sup>24</sup>. Primjenom novih analitičkih metoda i spektrometrije masa opsežna analiza fosfoproteoma tijekom

diferencijacije *S. coelicolor* na krutoj podlozi identificirala je 289 mjesta fosforilacije na 127 proteina. Identificirani fosfoproteini su uključivali brojne faktore sporulacije, transkripcijske regulatore, proteinske kinaze i druge regulatorne proteine uključene u morfološku diferencijaciju<sup>25</sup>. U zadnjoj studiji iz 2018., kvantitativna analiza (fosfo)proteoma *S. coelicolor* otkrila je dinamiku fosforilacije mnogih proteina među kojima su oni koji su uključeni u diferencijaciju i aktivaciju sekundarnog metabolizma<sup>26</sup>. Uzimajući u obzir studiju u kojoj je pokazano da ekspresija fosforiliranog regulatornog proteina *S. coelicolor* (AfsR) povećava proizvodnju antibiotika čak i kada se uvede u heterologne sustave drugih streptomicetnih vrsta<sup>27,28</sup>, za očekivati je da bi manipulacija mjesta fosforilacije ciljnih proteina mogla poboljšati proizvodnju sekundarnih metabolita ili aktivirati utišane biosintetske genske klustere (engl. *biosynthetic gene cluster* - *BGC*) i kod drugih industrijskih streptomiceta. Unatoč tim saznanjima, analiza fosfoproteoma nikada nije provedena s komercijalno važnim streptomicetama. Tijekom desetljeća industrijskog iskorištavanja bakterije *Streptomyces rimosus* za proizvodnju antibiotika komercijalni interes potaknuo je brojna istraživanja ove vrste pa je bakterija *S. rimosus* postala jedna od najbolje genetički opisanih streptomiceta<sup>29</sup>. Ova bakterija je najpoznatija kao primarni izvor oksitetraciklina (OTC), ali i drugih tetraciklinskih klasa antibiotika, koji se koriste protiv širokog spektra Gram-pozitivnih i Gram-negativnih patogena<sup>30,5</sup>. Značajna globalna tržišna vrijednost OTC-a ( $> 10^8$  kg/ god.) pokazuje veliku potrebu za poboljšanjem proizvodnih sojeva<sup>31</sup>. Bakterija *S. rimosus* ATCC 10970, također poznata kao G7 ili R7, divlji je tip koji je roditeljski ili ishodišni soj mnogih industrijskih sojeva koji se danas koriste za proizvodnju OTC-a<sup>29</sup>. Prvo sekvenciranje genoma ove bakterije objavljeno je 2013. godine<sup>32</sup>. Nedavno je genom ponovno sekvenciran pomoću PacBio (Pacific Biosciences) i od ove godine dostupan je u bazi NCBI pod pristupnim brojem CP048261<sup>33</sup>. Veličina genoma bakterije *S. rimosus* je 9,64 Mb (uključujući 0,29 Mb plazmida), što je unutar raspona drugih objavljenih sekvenci genoma streptomiceta. Procjenjuje se da genom ima ukupno 8 166 gena koji kodiraju proteine (od čega su 263 proteina kodirana genima na plazmidu), i dodatnih 68 gena za tRNA. Također je prema najnovijim sekvencama genoma bakterije *S. rimosus* predviđeno je da među genima koji kodiraju proteine ima potencijalno 32 gena za serin/treonin proteinske kinaze (STPK).

Cilj ovog rada bio je pratiti sintezu ukupnih proteina i dinamiku fosforilacije proteina na aminokiselinskim ostacima serina, treonina i tirozina tijekom različitih faza rasta dva odabrana soja bakterije *S. rimosus*, koji proizvode oksitetraciklin u značajno različitim koncentracijama

(referentnog divljeg soja i soja koji proizvodi visoke koncentracije OTC-a) i to primjenom spektrometrije masa visoke rezolucije uz biokemijsko obogaćivanje fosfopeptida.

Pretpostavka je bila kako bi identifikacija i usporedba dvaju proteoma i fosfoproteoma tijekom različitih faza rasta, kada dolazi do stanične diferencijacije praćene promjenom razine ekspresije i fosforilacije određenih proteina u odabranim sojevima mogla otkriti nove, i do sada neopisane regulatorne proteine i/ili proteine koji sudjeluju u kontrolnim mehanizmima proizvodnje OTC-a, a čija aktivnost je potencijalno regulirana putem fosforilacije.

Ova istraživanja su provedena u četiri koraka: (i) provedena je analiza morfoloških svojstava različitih sojeva bakterije *S. rimosus* dostupnih u laboratorijskoj kolekciji, (ii) optimiran je uzgoj odabranih bakterijskih sojeva i prikupljanje biomase tijekom tri specifične faze rasta, (iii) optimirana je priprema proteinskih/peptidnih uzoraka za identifikaciju (fosfo)proteoma spektrometrijom masa i (iv) provedene su bioinformatičke analize prikupljenih podataka za identifikaciju i usporedbu dinamike (fosfo)proteoma kod odabranih sojeva.

Prvo se intenzivno ispitivao rast bakterija i proizvodnja OTC-a pri različitim uvjetima rasta kako bi se odabrali kandidati za identifikaciju (fosfo)proteoma, kao i faze rasta u kojima će se uspoređivati (fosfo)proteomi. Zatim se provodio uzgoj odabranih bakterija u velikom razmjeru, a rast im se zaustavljao u specifičnim fazama rasta kako bi se prikupila stanična biomasa. Faze rasta su se određivale mjerenjem suhe biomase bakterija svakih nekoliko sati do 120 sati uzgoja bakterija u tekućem mediju. Iz prikupljene biomase su se izolirali ukupni proteini. Treći dio ovih istraživanja je uključivao pripremu proteina za kvantitativnu i kvalitativnu analizu spektrometrijom masa (razlaganje proteina na peptide, odsoljavanje i pročišćavanje peptida, obilježavanje peptida stabilnim izotopima, obogaćivanje fosfopeptida). Nakon izvedenih svih analiza na spektrometru masa i procesiranju dobivenih spektara u programu MaxQuant, uslijedila je detaljna i opsežna obrada dobivenih podataka u softveru Perseus, a podaci su se obrađivali i ručno u Excelu. Analizirani su podaci za svaki soj zasebno i to za različite faze rasta, a na kraju je napravljena i komparativna analiza identificiranih (fosfo)proteina između sojeva.



## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Streptomiceti – najbrojniji rod aktinobakterija

#### 2.1.1. Opće karakteristike streptomiceta i aktinobakterija

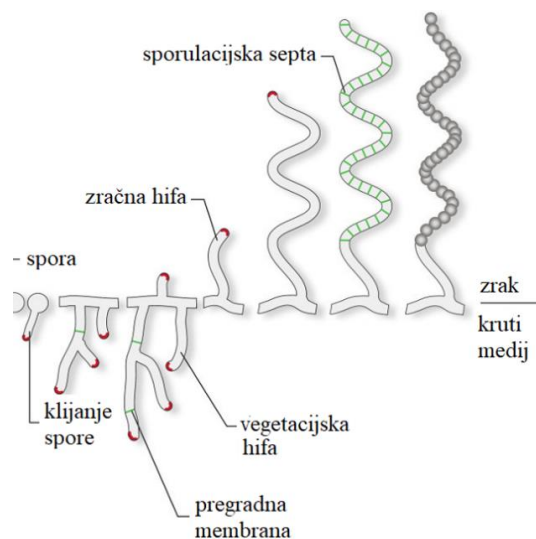
Streptomiceti (lat. *Streptomyces*) su Gram-pozitivne, višestanične bakterije koje čine najveći rod koljena Actinobacteria. Aktinobakterije su tijekom godina usvojile različite stilove života pa tako obitavaju u izobilju u različitim tlima, ali se pronalaze i u drugim ekološkim nišama, kao što su morski i slatkovodni ekosustavi. Osim toga, neke od aktinobakterija su i poznate kao patogeni kod ljudi, životinja i biljaka (npr. *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces listeri* i *Streptomyces scabies*). Ove bakterije poprimaju različite morfološke oblike, koji uključuju filamentozne strukture koje se fragmentiraju u štapićaste ili kokoidne oblike. Velik dio bakterija ovog koljena čine saprofiti koji sudjeluju u razgradnji biljnog i životinjskog materijala. Osim navedenih karakteristika, aktinobakterije, a među njima posebice streptomiceti, su poznate po svom izuzetnom potencijalu za proizvodnju bioaktivnih sekundarnih metabolita, posebice antibiotika, imunosupresora i protumorskih lijekova<sup>2</sup>. Aktinobakterije proizvode oko dvije trećine danas poznatih antibiotika, a od toga je oko 80 % iz roda *Streptomyces*, stoga su ove bakterije od izuzetnog medicinskog i industrijskog značaja<sup>34</sup>. Prema najnovijim podacima utemeljenim na sekvenciranju genoma, procjenjuje se da svaki soj ove vrste bakterija ima potencijal za proizvodnju 20-40 sekundarnih metabolita<sup>35</sup>.

Streptomiceti se pretežno nalaze u tlu i poznati su po proizvodnji spoja geosmin, koji daje karakterističan miris tlu<sup>4</sup>. Sve više istraživanja potvrđuje da su streptomiceti prisutni i u različitim morskim okolišima, što čini ove ekosustave osobito zanimljivim u potrazi za novim streptomicetnim vrstama s potencijalom sinteze novih biološki aktivnih spojeva<sup>36</sup>. Streptomicete karakterizira programirani i složeni životni ciklus koji uključuje morfološku diferencijaciju micelija, nalik diferencijaciji gljiva<sup>37</sup>. S obzirom na promjenjivost i složenost okoliša u kojem žive, gdje su izloženi stalnim promjenama i kompeticiji s drugim organizmima, tijekom svog životnog ciklusa stvaraju spore koje im omogućavaju preživljavanje i u nepovoljnim uvjetima<sup>37</sup>. Osim spora, još jedna prilagodba koja im pomaže u borbi za preživljavanje je već spomenuta sposobnost proizvodnje raznih sekundarnih metabolita, među kojima su i brojni bioaktivni spojevi, kao što su klinički važni antibiotici širokog spektra (npr.

tetraciklini, streptomycin i  $\beta$ -laktami), imunosupresivi (rapamicin) i lijekovi protiv raka (doksorubicin)<sup>38</sup>.

### 2.1.2. Životni ciklus streptomiceta

Tijekom svog životnog ciklusa, streptomiceti prolaze kroz morfološku diferencijaciju koja uključuje nekoliko razvojnih stadija. Životni ciklus streptomiceta je najviše proučavan kod modelne bakterije *S. coelicolor*. Morfološka diferencijacija započinje germinacijom spora koje u povoljnim uvjetima počinju klijati na krutoj hranjivoj podlozi. Tako nastaju vegetativne hife koje se bočno granaju i poprečno pregrađuju polupropusnim septama. U ovakvim odjeljcima hifa nalazi se veliki broj kopija kromosoma. Na krutoj podlozi, streptomicetne hife urastaju u podlogu tako tvoreći vegetativni (supstratni) micelij. U uvjetima stresa, kao što je nedostatak hrane, dolazi do razgradnje vegetativnog micelija i započinje rast zračnog micelija. Pregrađivanjem zračnih hifa nastaju septe i odjeljci s jednom kopijom kromosoma, a iz ovakvih odjeljaka nastaju zrele spore<sup>1</sup> čime se završava životni ciklus ovih izuzetno kompleksnih bakterija. Spore omogućavaju streptomicetima naseljavanje novih područja, kao i preživljavanje u nepovoljnim uvjetima.



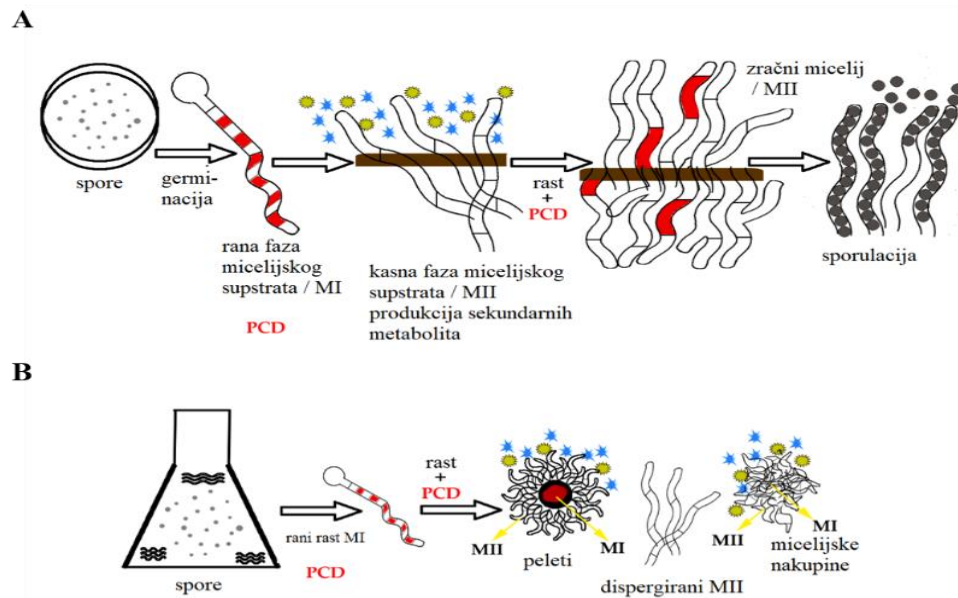
**Slika 1.** Životni ciklus streptomiceta. Životni ciklus streptomiceta započinje germinacijom spore i formiranjem vegetativnih hifa, koje se bočno granaju i pregrađuju septama, pri čemu nastaje vegetativni micelij. Usred nedostatka hrane, započinje rast zračnog micelija. Pregrađivanjem zračnih hifa sporulacijskim septama nastaju odjeljci s jednom kopijom kromosoma, od kojih se svaki razvije u jednu zasebnu sporu. Preuzeto i prilagođeno iz<sup>39</sup>.

Rast vegetativnog micelija postiže se bočnim grananjem hifa i izduživanjem na vrhovima hifa, a ne staničnom diobom. Ovim produžnim (apikalnim) rastom hifa upravlja citoplazmatski kompleks (polarisom) koji je ključan za umetanje peptidoglikanskog materijala na vrh hifa. Kao dio ovog kompleksa, protein DivIVA ima esencijalnu ulogu, obilježavanjem mjesta grananja hifa i produžnog rasta. Osim proteina DivIVA, u ovom kompleksu djeluju i Scy, dugački spiralno smotani protein te FilP, protein koji tvori filamente<sup>40,41</sup>.

Morfološka diferencijacija streptomiceta je izuzetno kompleksna, a kontroliraju je brojni regulatorni geni među koje spadaju i dvije glavne skupine gena: geni *bld*, koji su potrebni za razvoj zračnih hifa te geni *whi* koji su potrebni za stvaranje zrelih spora. Paralelno s morfološkom diferencijacijom kod bakterije *S. coelicolor* događa se i fiziološka diferencijacija koja uključuje sintezu sekundarnih metabolita, među kojima je najpoznatija proizvodnja antibiotika<sup>42</sup>. Sinteza antibiotika je u korelaciji s prijelazom iz vegetativnog u zračni micelij i potvrđena je i kod drugih modelnih streptomiceta, poput bakterije *Streptomyces griseus*. Kod ove bakterije je uočeno kako mutanti koji nemaju sposobnost stvaranja zračnog micelija također ne proizvode antibiotik, streptomycin<sup>43</sup>. U prilog tome, utvrđeno je da mutanti *bld* kod bakterije *S. coelicolor* ne uspijevaju formirati zračne hife i također, u mnogim od ovih mutanata je blokirana proizvodnja antibiotika<sup>44</sup>. Početak sinteze antibiotika uobičajeno korelira s ulaskom bakterije u programiranu staničnu smrt (engl. *programmed cell death*, PCD), tijekom čega se pokreću signalni putevi koji dovode do ekspresije gena koji potiču rast i razvoj zračnih hifa te proizvodnju antibiotika<sup>45</sup>.

Također, ovi nalazi navode na pretpostavku da morfološka i fiziološka diferencijacija dijele globalne regulatorne elemente i da geni poput npr. gena *bld* mogu kodirati za globalne regulatore odgovorne za uključivanje tih puteva.

S obzirom na to da većina streptomicetnih vrsta ne sporulira u tekućim kulturama, dugo se vremena smatralo da je morfološka diferencijacija ograničena na rast bakterija na krutoj podlozi. Međutim, većina proizvodnje antibiotika u industriji se provodi u tekućim kulturama u bioreaktorima. Manteca i sur. su izvijestili da se u tekućim kulturama također događa diferencijacija koja je usporediva s onom na krutoj podlozi (Slika 2)<sup>46</sup>. U tekućim kulturama klijanjem spora dolazi do razvoja peleta micelija (MI), u čijem se središtu događa programirana stanična smrt, nakon čega slijedi diferencijacija na periferiji peleta (MII). Kod većine vrsta ne dolazi do stvaranja zračnog micelija niti sporulacije, a hife tvore pelete i nakupine te u njima dolazi do proizvodnje antibiotika. Smatra se da su peleti i nakupine ključni za proizvodnju antibiotika, ali veza između njih nije razjašnjena.



**Slika 2.** Rast streptomiceta na krutoj podlozi (A) i u tekućoj podlozi (B) povezan s proizvodnjom sekundarnih metabolita. Na krutoj podlozi do aktivacije sekundarnog metabolizma dolazi u kasnoj fazi micelijskog supstrata s pojavom PCD u nasumičnim segmentima, prilikom stvaranja zračnog micelija, dok u tekućoj kulturi dolazi do aktivacije sekundarnog metabolizma na vanjskim hifama peleta u čijem središtu dolazi do PCD. Sekundarni metaboliti su prikazani žutim krugovima i plavim zvjezdicama. Preuzeto i prilagođeno iz<sup>46</sup>.

### 2.1.3. Opće karakteristike genoma streptomiceta

U odnosu na većinu ostalih bakterija streptomiceti imaju izuzetno velike genome, obično od 6 do 12 Mb s prosječno preko 7000 gena koji kodiraju za proteine<sup>6</sup>. Genome streptomiceta čine linearni kromosomi s visokim GC sadržajem (70 – 73 %) te kružni i linearni plazmidi<sup>47</sup>. Za usporedbu, njihovi genomi su skoro duplo veći od genoma Gram-negativnih bakterija, kao što su bakterije *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*, te im veličina prelazi veličinu genoma nižeg eukariota, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Ova karakteristika streptomiceta odražava njihovu razvojnu složenost, potencijal za prilagodbu na promjenjive niše u okolišu i sposobnost proizvodnje širokog spektra antibiotika i drugih bioaktivnih metabolita. Kako bi iskoordinirali odgovore na promjenjivo i kompetitivno okruženje u kojem se nalaze, velik dio njihovih gena ima regulatornu ulogu<sup>9</sup>. Procijenjeno je da više od 900 gena (~12 % ukupnih gena) ima

regulatornu ulogu u bakteriji *Streptomyces coelicolor* A3(2), koja je najproučavanija vrsta ovog roda<sup>8</sup>.

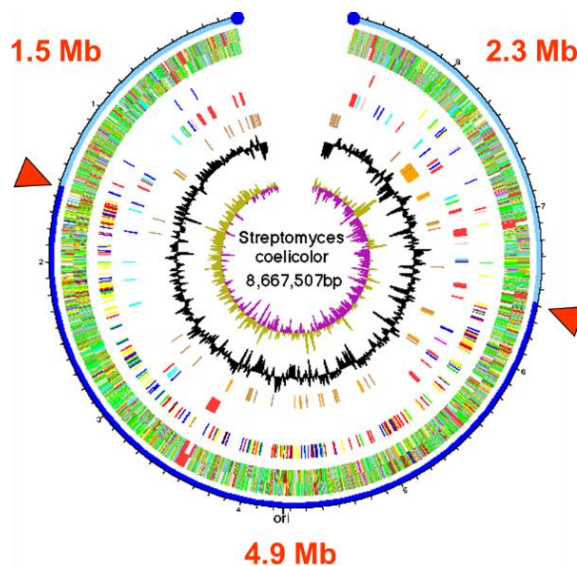
Bakterija *S. coelicolor* posjeduje jedan linearni kromosom veličine 8,66 Mpb na kojem se nalazi 7825 potencijalnih gena. Ovi geni uključuju više od 20 genskih klastera za biosintezu već poznatih, kao i dosad neopisanih sekundarnih metabolita, među kojima je najpoznatiji i najranije otkriveni pigmentirani antibiotik aktinorodin, koji je pri višim pH vrijednostima plave boje, a pri nižim crvene, što ga ujedno čini i indikatorom pH<sup>8</sup>.



**Slika 3.** Sporulirajuće kolonije bakterije *S. coelicolor* na krutoj podlozi. Na površini kolonija se vide plave kapljice antibiotika aktinorodina. Slika je dobivena ljubaznošću dr. sc. Želimire Filić.

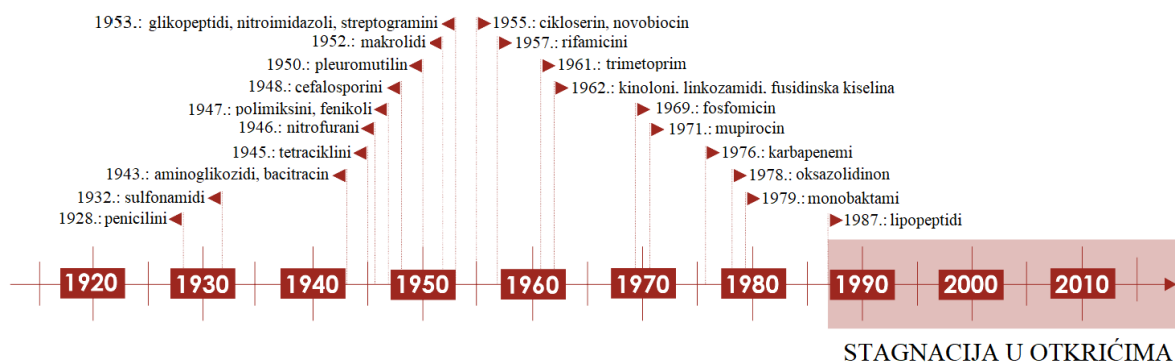
Općenito, linearni kromosom streptomiceta je podijeljen na središnji dio i na dva „kraka“ kromosoma (lijevi i desni), približno veličine 1,5-2,5 Mb (Slika 4)<sup>8</sup>. U središnjem dijelu kromosoma nalaze se esencijalni geni za rast i razvoj bakterije (geni za replikaciju, transkripciju, translaciju i primarni metabolizam DNA). Ova jezgra dijeli značajnu sinteniju s kompletnim kružnim genomima drugih aktinobakterija, uključujući i druge aktinobakterije kao što su *Mycobacterium tuberculosis* i *Corynebacterium diphtheriae*. S druge strane, na krakovima kromosoma se nalaze manje sačuvani geni za koje se smatra da nisu nužni za opstanak bakterije, kao npr. celulaza, hitinaza i genski enzimi ili genski klasteri za sekundarne metabolite. Geni koji kodiraju proteine sekundarnog metabolizma raspoređeni su u takozvane klaster biosintetskih gena (BGC). Više od dvije trećine genskih klastera za biosintezu sekundarnih

metabolita obično se nalaze u krakovima kromosoma. Pokazalo se da se delecije i izmjene genetskog materijala također mogu dogoditi u krakovima kromosoma bez gubitka vitalnosti u laboratorijskim uvjetima<sup>48</sup>. U kontekstu proizvodnje sekundarnih metabolita, bitni su i plazmidi<sup>37</sup>.



**Slika 4.** Kružni prikaz linearnog kromosoma bakterije *S. coelicolor*. Vanjska skala predstavlja veličinu kromosoma u megabazama. Tamno plavom bojom obilježen je središnji dio kromosoma (engl. *core region*), dok su svjetlo plavom bojom naznačeni krajevi kromosoma (engl. *arms*). Preuzeto iz<sup>8</sup>.

Iako je *S. coelicolor* najpoznatiji modelni organizam, nije od komercijalnog značaja. Otkriće streptomycina, izoliranog iz bakterije *S. griseus* 1943. god. dovelo je do početka tzv. zlatne ere antibiotika (1950. – 1970.), tijekom koje je identificiran najveći broj antibiotika (Slika 5)<sup>49</sup>. Nedugo nakon streptomycina, otkrivena je skupina tetraciklina, antibiotika širokog spektra, s klorotetraciklinom kao prvim identificiranim tetraciklinom. Nakon "zlatne ere", došlo je do stagnacije u otkriću novih antibiotika, te zadnjih 30 godina nije otkrivena niti jedna nova klasa, već su jedino istraživanja usmjerena na modifikacije postojećih antibiotika dala pozitivne rezultate<sup>50</sup>. Ovo trenutno predstavlja jedan od najvećih globalnih problema današnjice budući da je prekomjerna upotreba antibiotika dovela do razvoja višekратно rezistentnih bakterijskih patogena otpornih na antibiotike koji se trenutno vrlo često koriste u medicini. Posljedično, ovo je dovelo do velikog povećanja stope smrtnosti uzrokovane kod ljudi što predstavlja veliku opasnost u budućnosti<sup>51</sup>.



**Slika 5.** Kronološki slijed otkrivanja antibiotika. Preuzeto i prilagođeno s <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/how-did-we-end-up-here/few-antibiotics-under-development/>

#### 2.1.4. Bakterija *Streptomyces rimosus*

Od industrijskih sojeva svakako je jedna od poznatijih vrsta i bakterija *S. rimosus*, poznata po proizvodnji oksitetraciklina (OTC). Ova bakterija je također i jedna od najviše istraživanih industrijskih bakterija. Divlji tip *S. rimosus* ATCC 10970, je također poznat i kao G7 ili R7 soj. Genetičkim manipulacijama ovog soja nastali su mnogi drugi industrijski sojevi koji se i danas koriste u industriji za proizvodnju OTC-a. Početna istraživanja su se uglavnom provodila u tri istraživačke grupe: (i) u dva instituta u Moskvi (Rusija), (ii) u znanstveno istraživačkom centru kompanije Pfizer u suradnji s John Innes Centrom i sveučilištima Glasgow i Strathclyde (UK) te u (iii) Istraživačkom institutu PLIVA, u suradnji sa znanstvenom grupom na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu te Institutom Ruđer Bošković. Programi poboljšanja soja na *S. rimosus* koje su provodili Pfizer, PLIVA i KRKA u drugoj polovici 20. stoljeća doveli su do razvoja metoda za genetičku manipulaciju ove bakterije. Izvorni izolat *S. rimosus* G7 bio je izložen mnogobrojnim postupcima kemijske mutageneze. Ovaj proces je trajao više od 30 godina, a doveo je do selekcije sojeva s povećanom proizvodnjom OTC-a u rasponu od < 1g/L do preko 50 g/L<sup>29</sup>.

Sekvenciranje genoma ovog soja dovršeno je 2013. godine<sup>32</sup>. Nedavno je ponovno sekvenciran pomoću PacBio (Pacific Biosciences) i pohranjen u bazi NCBI pod pristupnim brojevima CP048261 (kromosom) i CP048262 (plazmid)<sup>33</sup>. Sekvenciranjem je procijenjeno da genom bakterije *S. rimosus*, veličine oko 9 351 267 pb (uključujući 0,29 Mb linearnog plazmida), i GC

sastava 71,88 %, sadrži 8 166 gena i 68 gena za tRNA. Među genima koji kodiraju proteine, predviđene su i 32 serin/treonin protein kinaze (STPK).

Na genomu se nalaze tri genska klastera za proizvodnju poznatih sekundarnih metabolita (oksitetraciklin, rimocidin i desferioksamin C) te oko 45 genskih klastera za biosintezu drugih sekundarnih metabolita čije funkcije još nisu razjašnjene, što ukazuje na veliki biosintetski potencijal ove vrste<sup>29,32</sup>.

## **2.2. Biosinteza sekundarnih metabolita kod streptomiceta**

### **2.2.1. Sekundarni metabolizam streptomiceta**

Sekundarni metaboliti su biološki aktivne male molekule koje nisu esencijalne za preživljavanje, ali igraju važnu ulogu u ekologiji i fiziologiji mikroba, jer mogu pružiti obranu od drugih mikroorganizama, sudjelovati u signalnim putevima ili međusobno djelovati kako bi povećali preživljavanje<sup>52,53</sup>. Bakterijski sekundarni metaboliti izvor su mnogih antibiotika, kemoterapeutskih lijekova, imunosupresiva i drugih lijekova. Aktivacija sekundarnog metabolizma događa se paralelno s morfološkom diferencijacijom, prilikom prijelaza iz vegetativnog u zračni micelij. Naime, prilikom ove morfološke tranzicije dolazi do lize vegetativnog micelija kako bi se osigurale hranjive tvari za razvoj zračnog micelija. Kako bi odbili potencijalne kompetitore u potrazi za hranjivim tvarima, streptomiceti odgovaraju proizvodnjom sekundarnih metabolita<sup>54</sup>.

Sekundarni metaboliti se općenito mogu podijeliti na 4 skupine: (i) spojeve s regulatornim aktivnostima, koji uključuju faktore rasta, morfogene agense i siderofore; (ii) antagonistički agensi, koji uključuju antiprotozoalne, antibakterijske, antigljivične kao i antivirusne lijekove; (iii) agrobiološka sredstva, koji uključuju insekticide, pesticide i herbicide; i (iv) farmakološke spojeve, koja uključuju neurološke lijekove, imunomodulatore, antitumorske lijekove i inhibitore enzima<sup>38</sup>. Među njima, svakako su prvi i najvažniji kod streptomiceta antibiotici. Streptomiceti proizvode više od 70% svih prirodnih bioaktivnih spojeva koji se koriste u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji<sup>55</sup>. Druga najvažnija grupa nakon antibiotika su enzimi, kao što su proteaze, lipaze, celulaze, amilaze, pektinaze i ksilanaze<sup>56</sup>. Sekvenciranje prvih genoma streptomiceta pokazalo je da je njihov biosintetski potencijal više od 10 puta veći od predviđenog u dotadašnjim studijama, no većina genskih klastera za proizvodnju sekundarnih



metabolita je utišana ili neaktivna u standardnim laboratorijskim uvjetima<sup>57,58</sup>. Stoga se za aktiviranje neaktivnih BGC-a koristi niz novih metoda, o kojima će biti više govora u daljnjem tekstu.

U sintezu sekundarnih metabolita uključeni su individualni enzimi ili multi enzimski kompleksi, a geni koji kodiraju za njih najčešće su raspoređeni unutar spomenutih genskih klastera (BGC). Šest je najčešćih puteva biosinteze sekundarnih metabolita uključuju: peptidni put, PKS (poliketid sintaze) put, NRPS (neribosomalne polipeptid sintaze) put, šikimatni put,  $\beta$ -laktamski sintetski put i put sinteze ugljikohidrata<sup>38</sup>.

Poliketidi su jedna od najvećih i najraznovrsnijih klasa sekundarnih metabolita. Biosinteza poliketida odvija se na velikim enzimskim kompleksima koji se nazivaju poliketid sintaze (PKS), iz jednostavnih građevnih blokova kao što su acetyl-CoA i malonil-CoA<sup>59</sup>. Prema načinu djelovanja i strukturi podijeljeni su na tri tipa (PKS tipa I, II i III). Poliketidi uključuju polifenole, makrolide, poliene, polietere i u prirodi imaju ulogu pigmenata, faktora virulencije i antibiotika<sup>60</sup>. Posebno su zanimljivi sa stajališta medicine i veterine, budući da mnogi poliketidni spojevi imaju terapijska svojstva, kao što su npr. antibiotici, imunosupresivi, antiparazitici, lijekovi za snižavanje kolesterola, lijekovi protiv raka, itd.

### 2.2.2. Tetraciklini

Tetraciklini (TC) su poliketidi, prirodni spojevi koji obuhvaćaju najznačajnije kliničke antibiotike prirodnog, ali mogu biti i semisintetskog podrijetla. Ova grupa antibiotika se koristi još od 1940.-ih godina protiv širokog spektra Gram-pozitivnih i Gram-negativnih patogena, mikoplazmi, intracelularnih klamidija, rikecija i protozoalnih parazita<sup>30</sup>. Prvi član ove grupe antibiotika bio je klortetraciklin (aureomicin), izoliran iz bakterije *S. aureofaciens* 1945. god. Nakon njega, 1950. je iz bakterije *S. rimosus* izoliran oksitetraciklin (teramicin)<sup>61</sup>. Tetraciklinski antibiotici imaju karakterističnu jezgru koja se sastoji od četiri linearno povezana prstena (A, B, C i D) na koju su vezane različite funkcionalne skupine. Tetraciklini uglavnom imaju bakteriostatski učinak. Mehanizam njihova djelovanja je vezanje na 30S ribosomsku podjedinicu pri čemu sprječavaju vezivanje aminoacil-tRNA na ribosomsko akceptorsko (A) mjesto i tako inhibiraju sintezu proteina<sup>62</sup>.

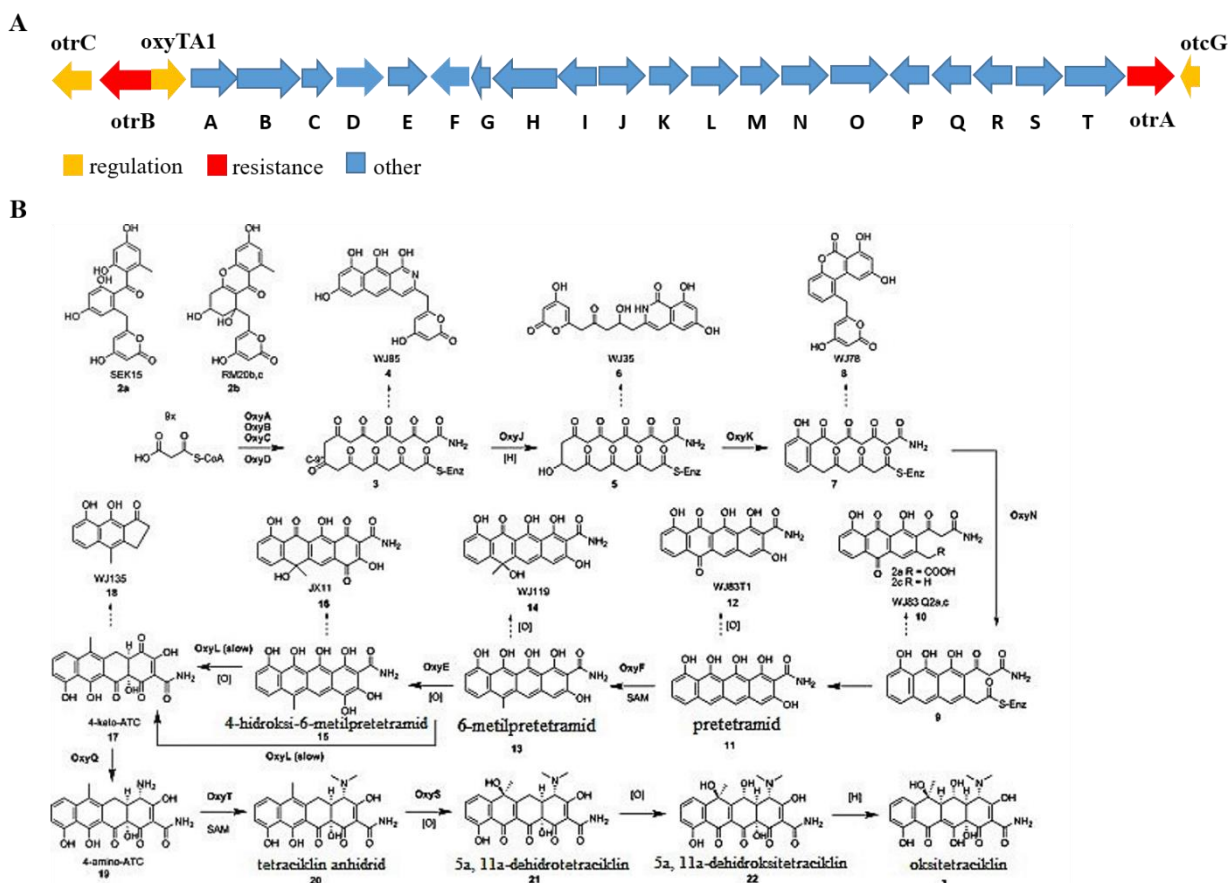
Globalni problem povećane rezistencije patogena na postojeće antibiotike, pa tako i na tetracikline je doveo do značajnog pada uporabe tetraciklinskih antibiotika. Napori istraživača usmjereni prema pronalasku novih prirodnih tetraciklinskih antibiotika bili su neuspješni, jer se uglavnom otkrivaju već poznate strukture ove grupe antibiotika. Stoga su primijenjene metode ciljanih modifikacija (semisintetska sinteza) već poznatih struktura tetraciklina kako bi se poboljšala njihova učinkovitost, odnosno onemogućili mehanizmi mikrobne rezistencije. Zato su uvedeni tetraciklini druge generacije (minociklin i doksiciklin), a potom i najrecentnije, treće generacije. Tako je npr. 2005. god. došlo do sinteze glicilciklina – tetraciklina treće generacije (tigeciklin), koji imaju slično antibakterijsko djelovanje kao tetraciklini prve generacije, i koji se trenutačno često upotrebljavaju<sup>63</sup>.

### 2.2.3. Oksitetraciklin

Oksitetraciklin je tetraciklinski antibiotik koji inhibira sintezu proteina u bakterijama reverzibilnim vezanjem na ribosome, kao što je spomenuto. Značajna globalna tržišna vrijednost OTC-a ( $> 10^8$  kg godišnje) naglašava potrebu za poboljšanjem produktivnosti komercijalnih sojeva<sup>29</sup>. Genski klaster za sintezu OTC-a veličine je oko 30 kb i sastoji se od 25 pojedinačnih gena čiji produkti sudjeluju u sintezi i modifikaciji poliketidne okosnice antibiotika (Slika 6A). Osim gena za biosintezu antibiotika, na krajevima klastera za biosintezu OTC-a se nalaze i tri regulatorna gena, kao i tri gena koja su odgovorna za otpornost bakterije na OTC<sup>64</sup>, od kojih je jedan smješten izvan klastera. U prvom koraku sinteze poliketidne okosnice osim minimalnih poliketid sintaza tipa II (KS $\alpha$ -OxyA, KS $\beta$ -OxyB i ACP-OxyC) sudjeluju i amidotransferaza OxyD, kao i acil transferaza OxyP (Slika 6B). Minimalne poliketid sintaze kataliziraju kondenzaciju početne jedinice (malonil-CoA) i 8 produžnih malonil-CoA jedinica u amidiranu deketidnu okosnicu, dok enzimi iz klastera sudjeluju u modifikaciji ovako nastale poliketidne okosnice antibiotika<sup>65</sup>.

U regulaciji sinteze OTC-a sudjeluje protein regulator OtcR, koji pripada dobro poznatoj grupi regulatora SARP (engl. *Streptomyces antibiotic regulatory protein*), a djeluje kao pozitivan specifični regulator. Prekomjerna ekspresija ovog gena dovodi do značajnog povećanja biosinteze OTC-a. Drugi protein regulator je LuxR koji pripada LAL porodici transkripcijskih regulatora i pokazano je da njegova inaktivacija uzrokuje smanjenje proizvodnje OTC-a, iako njegova prekomjerna ekspresija ne uzrokuje bitno povećanje sinteze antibiotika<sup>66</sup>.

Kao što je prije navedeno, tri su gena koji kodiraju proteine odgovorne za otpornost na antibiotik, *otrA*, *otrB* i *otrC*. Protein OtrA štiti ribosom od zaustavljanja translacije uzrokovanog OTC-om<sup>67</sup>. Gen koji kodira za ovaj protein je smješten na desnom kraju genskog klastera za OTC (Slika 6A), a homologe proteina OtrA su pronađeni u mnogim kliničkim patogenima koji uzrokuju infekcije rezistentne na tetraciklin (kodirane genima *tetO* i *tetM*). Proteini kodirani ovim genima pomažu u uklanjanju tetraciklina s inhibitornog mjesta na ribosomu<sup>5</sup>. Drugi gen za otpornost, *otrB*, kodira integralni membranski protein koji je odgovoran za refluks OTC-a iz stanice. Ovaj gen je reguliran susjednim trećim regulatornim genom iz klastera, genom *oxyTA1* koji pripada porodici represora MarR<sup>68</sup>. Zadnji, gen *otrC*, koji nije smješten unutar genskog klastera za OTC, osigurava nižu razinu otpornosti protiv OTC-a. Nedavna studija pokazala je da gen *otrC* kodira protein s ATPazom i refluksnom aktivnošću više antibiotika<sup>5</sup>.



**Slika 6.** Klaster gena za proizvodnju OTC-a (A). Mehanizam sinteze OTC-a (B). Preuzeto i prilagođeno<sup>5</sup>.

#### 2.2.4. Regulacija biosinteze antibiotika u streptomicetima

Biosinteza antibiotika je kod bakterija izuzetno složen i strogo reguliran proces koji često uključuje nekoliko interferirajućih signalnih puteva ili kaskada i niz različitih klasa regulatornih proteina ili signalnih molekula. Proizvodnja antibiotika kod streptomiceta je najčešće regulirana na tri razine: signalnim molekulama, transkripcijskim regulatorima (globalnim ili specifičnim) ili putem povratnih informacija (Slika 7)<sup>69</sup>.

Jedan od najbolje proučavanih signalnih putova uključuje A-faktor. A-faktor, po kemijskoj strukturi spada u klasu  $\gamma$ -butirolaktona, a prva je pronađena i najviše proučavana signalna molekula kod streptomiceta. Još 1967. godine je utvrđeno da je ovo esencijalna molekula koja potiče proizvodnju streptomicina u bakteriji *Streptomyces griseus*. Za biosintezu A-faktora je odgovoran protein AfsA. Sinteza A-faktora započinje tijekom eksponencijalne faze bakterijskog rasta i poput hormona djeluje u izuzetno malim koncentracijama. Naime, kada

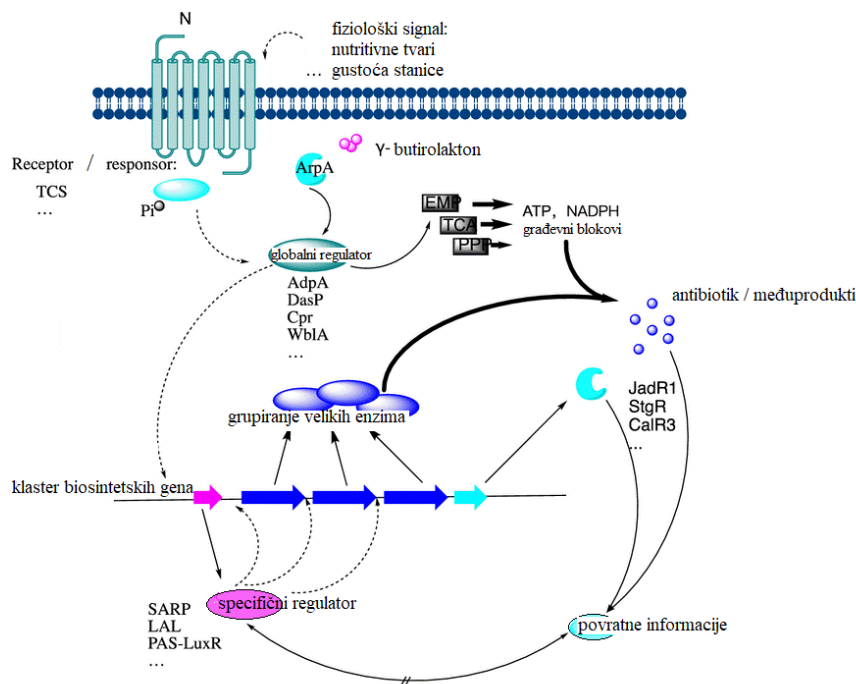
dosegne nM koncentracije u stanici dolazi do vezanja A-faktora na protein receptor ArpA što dovodi do de-represije transkripcije gena *adpA* (Slika 7). Zatim, transkripcijski aktivator AdpA iz porodice regulatora AraC/XylS, aktivira na stotine gena (Adp regulon) koji kodiraju za proteine važne za morfološki razvoj i sekundarni metabolizam. Jedan od mnogih ciljnih gena proteina AdpA je promotor regulatornog gena *strR*. AdpA veže u obliku dimera regiju uzvodno od *strR* promotora i aktivira njegovu transkripciju. Nakon sinteze pozitivnog regulatora StrR dolazi do aktivacije transkripcije različitih gena uključenih u biosintezu streptomicina<sup>70,71</sup>.

Transkripcijski regulatori streptomiceta se mogu podijeliti na pleiotropne ili globalne i specifične, smještene unutar klastera (engl. *pathway-specific* ili *cluster situated*, CSR), regulatore. Pleiotropni ili globalni regulatori su smješteni izvan klastera i mogu regulirati više nezavisnih staničnih procesa, npr. razinu biosinteze više različitih antibiotika i/ili morfološku diferencijaciju<sup>72</sup>. Specifični regulatori su smješteni unutar samog klastera za sintezu antibiotika i reguliraju razinu antibiotika izravno preko regulacije ekspresije gena smještenih u klasteru. Regulatorima smještenim unutar klastera (CRS) pripadaju najčešće članovi porodice SARP, LAL i PAS LuxR.

Regulatori porodice SARP ostvaruju svoje funkcije izravnim kontroliranjem razine transkripcije biosintetskih gena ili drugog CSR-a unutar klastera. Ove proteine karakterizira zavijeni HTH motiv na N-terminalnim krajevima i aktivacija transkripcije ciljnih gena vezanjem na heptamerna mjesta ponavljanja koja se ponekad preklapaju s -35 regijom srodnih promotora. Oni izravno reguliraju ekspresiju ciljnih gena povezanih sa sekundarnim metabolizmom bez primanja vanjskih signala ili u interakciji s nizvodnim proteinima. Jedan od najpoznatijih predstavnika ove porodice je ActII-ORF4, koji aktivira sintezu aktinorodina u bakteriji *S. coelicolor*<sup>73</sup>.

Još neke važne grupe regulatora smještenih unutar klastera su porodice TetR i LysR koji za razliku od SARP-ova uglavnom djeluju kao represori, kao i porodica MarR transkripcijskih regulatora<sup>72</sup>. TetR i MarR također imaju važnu regulatornu ulogu u otpornosti na antibiotike.

Posljednji način regulacije sinteze antibiotika je putem povratnih informacija koju aktiviraju novonastali produkti, npr. antibiotici i/ili međuprodukti za koordinaciju biosinteze i transporta antibiotika. Naime, brojna istraživanja su pokazala da antibiotik može funkcionirati i kao signal za regulaciju proizvodnje antibiotika (Slika 7)<sup>74,75</sup>.



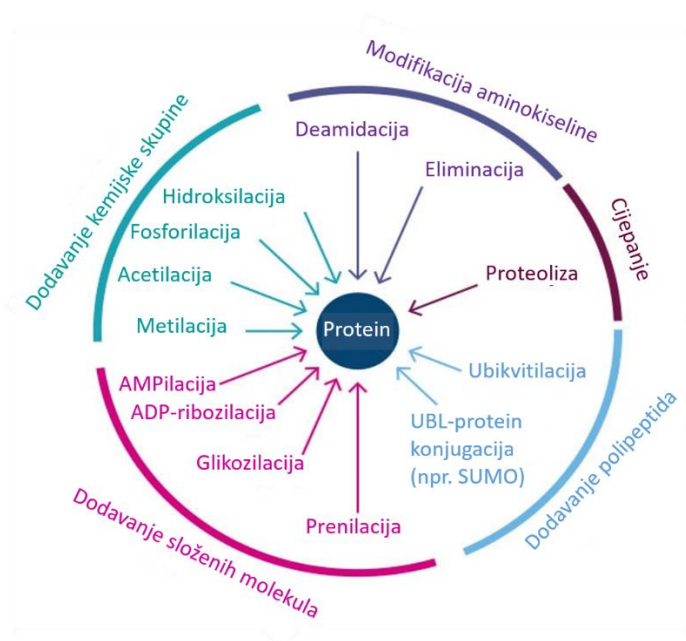
**Slika 7.** Shema različitih načina regulacije sinteze antibiotika u streptomicetima. Preuzeto i prilagođeno iz<sup>35</sup>.

Zahvaljujući brzom razvoju novih metoda za sekvenciranje te izuzetno brzim prikupljanjem i akumulacijom podataka o genomima brojnih bakterija, postalo je jasno da je broj predviđenih biosintetskih genskih klastera (BGC) na genomima mnogo veći od broja prirodnih spojeva koji su identificirani. Do sada se bakterije roda *Streptomyces* još uvijek smatraju najperspektivnijim kandidatima za otkrivanje novih antibiotika, posebno u morskom okolišu, gdje je u novije vrijeme otkriveno nekoliko klasa strukturno jedinstvenih biološki aktivnih spojeva. Općenito, većina ovih genskih klastera je utišana u uvjetima rasta u laboratoriju, što je i dovelo do velikog broja neotkrivenih sekundarnih metabolita. Za aktiviranje ovih neaktivnih BGC-a koristi se niz novih metoda, od kojih se većina temelji na genetičkim manipulacijama streptomiceta, kao npr. povećana ekspresija ciljanih gena ili inaktivacija globalnih i specifičnih regulatora koji kontroliraju biosintezu sekundarnih metabolita, heterologna ekspresija BGC-a u različitim domaćinima i/ili ciljane promjena ribosomskih proteina (tzv. *ribosomal engineering*), itd.<sup>76,58</sup>. Stoga je razumijevanje regulatornih mehanizama sinteze antibiotika od ključne važnosti za pronalazak novih antibiotika, kao i poboljšanje proizvodnje postojećih. Posebno treba istaknuti da jedan od važnih načina regulacije biosinteze antibiotika uključuje post-translacijske modifikacije regulatornih proteina ili proteina uključenih u biosintezu antibiotika<sup>77</sup>.

### 2.3. Post-translacijske modifikacije

Post-translacijske modifikacije (PTM) su kovalentne preinake proteina koje mogu odrediti funkciju, lokalizaciju proteina ili kontrolirati njihove interakcije s drugim proteinima. Kao takve sudjeluju u brojnim regulatornim staničnim procesima. S obzirom da stanice trebaju odgovoriti na vanjske i unutarnje signale u kratkom vremenu, ovaj način regulacije putem reverzibilnih i ireverzibilnih modifikacija je od ključne važnosti za stanice kako bi brzo reagirale na različite podražaje ili promjene uvjeta okoliša u kojem obitavaju. S obzirom na značaj uloga PTM u raznim procesima, od metabolizma do proizvodnje sekundarnih metabolita, zadnjih nekoliko desetljeća se ovaj tip regulacije intenzivno istražuje. Do sada je otkriveno preko 300 PTM koje reguliraju funkcije proteina različitih organizama<sup>78</sup>. Bakterije su u svom prirodnom staništu konstantno izložene različitim promjenama, koje uključuju npr. nedostatak hranjivih tvari, promjene temperatura i stalnu borbu za prevlast s drugim mikroorganizmima. Stoga nije iznenađujuće da bakterije također u odgovoru na ove vanjske signale koriste složenu mrežu posttranslacijskih modifikacija za brzi prijenos signala i regulaciju staničnih funkcija.

PTM su vrlo raznolike i mogu se podijeliti u pet skupina (Slika 8): (i) modifikacija kemijske strukture bočnih lanaca aminokiselina, (ii) dodavanje funkcionalnih grupa aminokiselinskim ostacima, (iii) dodavanje složenih molekula specifičnim aminokiselinama, (iv) dodavanje polipeptida ili malih proteina i (v) cijepanje peptidne veze (proteoliza).



**Slika 8.** Pregled posttranslacijskih modifikacija u bakterijama. Preuzeto s <https://www.ptglab.com/news/blog/post-translational-modifications-an-overview/>

Jedna od najizučavanijih PTM svakako je fosforilacija i brojne studije su potvrdile njihove ključne uloge u regulaciji raznih staničnih procesa u većini organizama.

Fosforilacija proteina u eukariotskim organizmima prvi puta je potvrđena tijekom prve polovice prošlog stoljeća. Fosforilacija u bakterijama prvi puta je identificirana 1970-ih godina prošlog stoljeća<sup>79</sup>. Međutim, do ranih 1980-ih, većina istraživanja je bila usredotočena na tzv. “dvokomponentne” fosforilacijske sustave (opisano detaljnije u paragrafu 3.2.2.1.). Tako se dugo godina smatralo da su serin, treonin i tirozin kinaze ograničene na eukariotske organizme, dok u bakterijama samo postoje histidin kinaze. Međutim, razvojem sekvenciranja genoma, identificirani su mnogobrojni geni koji kodiraju za serin/treonin kinaze i u bakterijskim genomima, kao što je potvrđeno i postojanje gena za histidin kinaze u eukariotima<sup>80</sup>.

Razvojem tehnologije spektrometrije masa, otkriveno je na desetke S/T/Y kinaza u genomima različitih bakterija i danas se zna da je to jedan od glavnih načina regulacije raznih procesa u bakterijama, kao što su rast i dioba stanica, sporulacija, stanični odgovor na stres, metabolički procesi i mnogi drugi<sup>81</sup>.

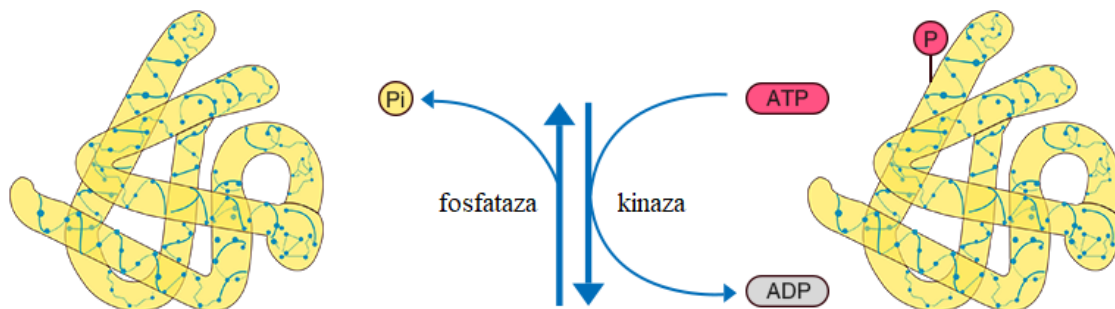
### 2.3.1. Fosforilacija proteina

Fosforilacija je kovalentno dodavanje fosforne kiseline ciljnom proteinu i događa se prijenosom  $\gamma$ -fosfatne skupine s adenzin 5'-trifosfata (ATP) na hidroksilnu skupinu specifične aminokiseline. Fosforilacija je reverzibilna reakcija u kojoj se održava konstantna ravnoteža između fosforilacije i defosforilacije, u kojoj posreduju proteinske kinaze, koje dovode fosfatnu skupinu na specifično mjesto u proteinu i proteinske fosfataze, koje uklanjaju fosfatne skupine s aminokiselinskog ostatka neke specifične aminokiseline (Slika 9). Ovaj dinamičan proces mijenja strukturnu konformaciju ciljnog proteina i tako regulira njegovu biološku funkciju, bilo da ga aktivira ili deaktivira. Osim toga, fosforilacija može služiti kao signal prepoznavanja za interakciju s drugim proteinima.

Najčešći aminokiselinski ostaci proteina na kojima se događa fosforilacija su serinski, treoninski i tirozinski, a fosforilirati se mogu i histidinski, aspartatski, glutamatski, argininski, lizinski i cisteinski aminokiselinski ostaci<sup>82</sup>. Prilikom fosforilacije različitih aminokiselina mogu se formirati različite kemijske veze s različitim termodinamičkim karakteristikama, pa



tako razlikujemo četiri tipa veze. Aminokiselinski ostaci serina, treonina i tirozina stvaraju fosfomonoestersku vezu koja je termodinamički relativno stabilna u kiselom, ali je nestabilna u alkalnom okruženju. S druge strane, histidinski, lizinski i argininski ostaci formiraju fosforamidatne veze visoke energije, koje su labilne u kiselom, a u alkalnom stabilne<sup>83</sup>. Aspartat i glutamat tvore miješani anhidrid ili acil-fosfat, slične termodinamike kao fosforamidati. Pokazalo se da je visoka energetska veza fosforiliranog arginina čak dovoljna da potakne pretvorbu od ADP do ATP. Konačno, cisteinski aminokiselinski ostaci stvaraju fosfotiolate koji također imaju relativno visoku količinu slobodne energije. Što je veća slobodna energija, to su te fosforilacije labilnije, što otežava otkrivanje fosforamida, acil-fosfata ili fosfotiolata u usporedbi s fosfomonoesterima<sup>82</sup>. Nadalje, s obzirom na to da je tip veze koji stvaraju serin, treonin i tirozin stabilan u kiselom, za razliku od histidina, arginina i lizina, puno je lakše istraživati ovaj tip fosforilacije jer su protokoli za obogaćivanje fosfopeptida optimizirani za kisele uvjete. Različita kemijska svojstva fosfatnih veza definiraju stabilnosti ovih devet različitih mjesta fosforilacije, a time i tijek i kinetiku prijenosa fosfata, kao i njihove biološke funkcije<sup>83</sup>.



**Slika 9.** Shematski prikaz reakcije fosforilacije i defosforilacije. Preuzeto i prilagođeno <https://www.elabscience.com/List-detail-291.html>

Bakterije koriste fosforilaciju kao regulatorni mehanizam za brzi odziv stanica na neke promjene životnih uvjeta, primanjem unutarstaničnih ili izvanstaničnih podražaja. Nakon primanja signala, može doći do prijenosa informacije direktno na ciljni protein ili se može pokrenuti čitav niz kaskadnih reakcija sve do stanične jezgre.

Fosforilacijom su regulirane razne stanične aktivnosti kao što su centralni i sekundarni metabolizam, odgovor na stres, virulenciju, diobu stanica itd. Prema prvim procjenama, oko 30% ljudskih proteina je fosforilirano u svakom trenutku, a kasnija studija je pokazala da je najmanje 75% svih ljudskih proteina fosforilirano *in vivo* tijekom životnog ciklusa stanice<sup>17</sup>.

### 2.3.2. Bakterijske proteinske kinaze

Veliki broj kinaza prisutan u bakterijama može se podijeliti na pet tipova: histidin kinaze, serin/treonin kinaze, tirozin kinaze, atipične serin kinaze i arginin kinaze.

#### 2.3.2.1. Histidin kinaze

Dvokomponentni sustavi (engl. *two component systems*, TCS), koji uključuju fosforilaciju na histidinskim aminokiselinskim ostacima, su najviše proučavani u bakterijama. Ove signalne kaskade se sastoje od senzor kinaze uklopljene u staničnu membranu i unutarstaničnog odgovarajućeg regulatora (engl. *response regulator*)<sup>84</sup>. U odgovoru na izvanstanične podražaje dolazi do autofosforilacije senzor kinaze na histidinu te prijenosa fosfatne skupine na aspartatni aminokiselinski ostatak odgovarajućeg, najčešće transkripcijskog regulatora, koji pri različitim stanjima fosforilacije može djelovati kao aktivator ili represor transkripcije gena, vezanjem izravno na njihove regulatorne elemente DNA (Slika 10A). Kako bi se održao ispravan tijek informacija u signalnom putu, svaki par histidin kinaze i odgovarajućeg regulatora mora selektivno prepoznavati jedan drugog, bez ili s minimalnom komunikacijom s drugim dvokomponentnim sustavima.

Brojna istraživanja su pokazala da je regulacija putem TCS-a kritična za razne fiziološke funkcije, uključujući sporulaciju, sintezu staničnog zida, otpornost na antibiotike i oksidativni stres, stvaranje biofilмова itd.<sup>85,86</sup>.

### 2.3.2.2. Serin/treonin kinaze (STK)

Fosforilacija na aminokiselinskim ostacima serina, treonina i tirozina je dugi niz godina izučavana u eukariotima, dok se za prokariote smatralo da ne posjeduju ovaj tip fosforilacije. Razvojem tehnologija u genomici i proteomici, identificirane su prve S/T kinaze (STK) nalik eukariotskim (engl. *Eukaryotic-like serine/threonine kinases*, eSTPK) i u prokariotima, i sada se zna da je to važan način regulacije njihovih staničnih procesa. Ove kinaze se još nazivaju i kinaze Hanks-tipa (engl. *Hanks-type kinases*)<sup>12</sup>. Prema najnovijim istraživanjima, smatra se da ove kinaze zapravo imaju isto podrijetlo te da ih bakterije nisu dobile horizontalnim prijenosom od eukariota, stoga je predloženo da njihov jedini naziv ostane kinaze Hanks-tipa, prema autoru koji ih je prvi opisao<sup>87</sup>.

Kinaze Hanks-tipa su obično transmembranski proteini koji sadrže visoko sačuvanu katalitičku kinaznu domenu smještenu u citosolu i izvanstaničnu senzorsku domenu (Slika 10B). Katalitička domena je sastavljena od 12 podjedinica, a njen najvažniji strukturni element koji regulira aktivnost kinaze je aktivacijski segment koji sadrži nekoliko sačuvanih motiva (aktivacijska, katalitička, P/P+1 petlja te petlja za vezanje  $Mg^{2+}$ )<sup>88,89</sup>. Aktivacijska petlja određuje specifičnost supstrata zajedno s ostalim strukturnim elementima i može se fosforilirati na serinskim, treoninskim i tirozinskim aminokiselinskim ostacima autofosforilacijom ili transfosforilacijom putem drugih kinaza. U većini kinaza, fosforilacija aktivacijske petlje dovodi do konformacijske promjene koja omogućuje vezanje supstrata i aktivaciju kinaze. Zatim, P+1 petlja je u interakciji sa supstratom i određuje specifičnost kinaze, a glicin-bogata P-petlja je važna za razmjenu ATP/ADP tijekom katalitičke reakcije. Nakon što se ATP postavi na aktivno mjesto, katalitički aspartat prenosi  $\gamma$ -fosfat s ATP-a na specifične aminokiselinske ostatke supstrata<sup>87</sup>.

Osim katalitičke domene, mnoge STK sadrže dodatne domene za vezanje liganda i/ili ostvarivanje interakcija s drugim proteinima, kao što je tzv. izvanstanična PASTA domena (engl. *Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase-Associated*)<sup>90</sup>. PASTA domene su ograničene na prokariote, posebice za Gram-pozitivne bakterije.

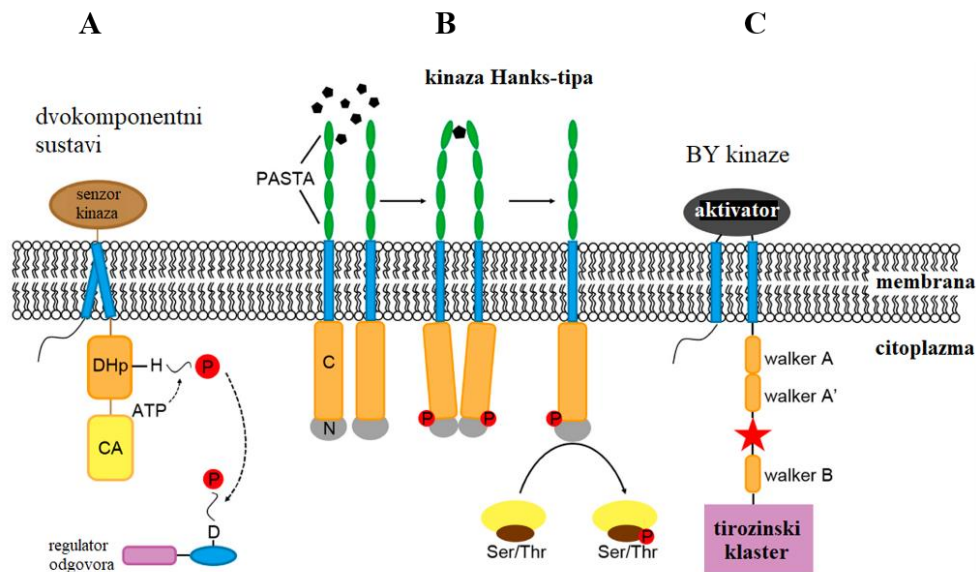
Za razliku od histidin kinaza koje su strogo selektivne, ove kinaze mogu fosforilirati velik broj supstrata i na taj način pokrenuti kaskadu različitih događaja u stanici, te je samim time puno teže izučavati njihove biološke funkcije.

Istraživanja su pokazala da postoji i komunikacija STK s TCS. Npr. U bakteriji *Enterococcus faecalis*, dokazano je da TCS CroS/CroR i STK IreK posreduju u otpornosti na nekoliko  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Fosforilacija histidinske kinaze CroS posredovana ST kinazom IreK povećava ekspresiju regulona CroS/R kao odgovor na antibiotike, čime se omogućuje otpornost na antibiotike<sup>15</sup>.

### 2.3.2.3. Tirozin kinaze

U fosforilaciji tirozinskih aminokiselinskih ostataka sudjeluju tirozin kinaze (BY kinaze), koje su prisutne samo u bakterijama. Sastoje se od izvanstanične domene i citosolne katalitičke domene, a dijele neki sličnosti s ATP-azama<sup>91</sup>. Katalitičku domenu čine četiri očuvana strukturna motiva, motiv Walker A i B koji sadrže mjesto vezanja ATP-a, dodatni Walkerov B motiv nazvan A' i manje sačuvani C motiv koji sadrži više tirozina (tzv. Y-klaster) i predstavlja mjesto autofosforilacije (Slika 10C). BY kinaze tvore oktamere u kojima se tirozinski klaster jednog monomera locira na katalitičkom mjestu susjednog monomera<sup>92</sup>.

U proteobakterijama je pokazano da su BY kinaze prisutne kao jedan membranski protein sastavljen od izvanstanične domene i citosolne katalitičke domene, dok bakterije reda Firmicutes posjeduju BY kinaze u obliku dva pojedinačna polipeptida koji postaju aktivni tijekom interakcije. Ove kinaze mogu, kao i kinaze Hanks-tipa, fosforilirati velik broj supstrata. Velika većina gena koji kodiraju ove kinaze su smješteni u operonima za sintezu i transport izvanstaničnih polisaharida, no u novije vrijeme su dokazane i njihove druge funkcije<sup>93</sup>. Osim proteina koji sudjeluju u proizvodnji polisaharida, među prvim supstratima ovih kinaza identificirani su sigma faktori RNA polimeraze te *single stranded DNA binding protein* (SSB), a potom i mnogi drugi<sup>94</sup>.



**Slika 10.** Mehanizmi prijenosa signala različitim tipovima kinaza u bakterijama. (A) Histidin kinaze; (B) Serin/ treonin kinaze; (C) Tirozin kinaze. Preuzeto i prilagođeno iz<sup>95</sup>.

Općenito, dok su opisane vrste kinaza široko rasprostranjene u bakterijama, neke su ograničene samo na neke vrste (atipične ST kinaze). Atipične ST kinaze ne pokazuju homologiju sa sekvencama kinaza Hanks-tipa, ali se mogu autofosforilirati i fosforilirati na serinskim i treoninskim aminokiselinskim ostacima (npr. YihE i HipA *E. coli*). YihE je uključen u Cpx odgovor na stres i puteve stanične smrti, a HipA regulira stvaranje bakterijskih tzv. *perzistera* fosforilacijom tRNA sintetaze<sup>96</sup>. Također, postoje i neuobičajene kinaze s dvojnoulogom koje mogu obavljati i fosforilaciju i defosforilaciju<sup>97</sup>. Jedan takav primjer je Hpr kinaza/fosforilaza (HprK/P) koja je uključena u sustav fosfotransferaze (PTS) koji omogućuje prijenos šećera preko stanične membrane.

Općenito bi se moglo reći da su histidin kinaze i atipične ST kinaze uključene u regulaciju ekspresije gena i kontrolu metabolizma, dok tirozin kinaze i kinaze Hanks-tipa reguliraju nekoliko aspekata fiziologije bakterija.

Što se tiče arginin kinaza, za njih je pokazano da sudjeluju u staničnom odgovoru na stres i virulenciju bakterija. Arginin kinaze (R kinaze) posjeduju sačuvani cistein, tzv. NEED segment i glutamat smješten u fleksibilnoj petlji (engl. *Glu-loop*). Ove tri domene stabiliziraju i orijentiraju arginin supstrata u prijelaznom stanju reakcije prijenosa fosfata. Fosforilacija na argininu prvi put je pronađena u bakteriji *B. subtilis* otkrićem da je kinaza McsB<sup>98</sup> odgovorna

za fosforilaciju arginininskog ostatka represora CtsR<sup>99</sup>. Nedavne studije o fosforilaciji proteina na argininu pokazale su povezanost McsB s odgovorom na stanični stres i kontrolu kvalitete proteina kao što je ClpP-ClpC sustav za degradaciju proteina.

### 2.3.3. Istraživanja fosfoproteoma kod bakterija

Tradicionalna fosfoproteomika, koja se koristila u bakteriologiji prije 2007. godine, oslanjala se na korištenje radioaktivno obilježenog ATP-a (<sup>32</sup>P) i imunodetekciju metodom Western blot koristeći antitijela specifična na mjesta fosforilacije jednog ili više proteina, nakon čega je uslijedilo istraživanje fosfoproteoma primjenom spektrometrije masa niske rezolucije korištenjem dvodimenzionalnih (2D) elektroforeznih gelova. Iako 2D gel-elektroforeza omogućuje odvajanje stotina proteina istovremeno, na ovaj način nije bilo moguće identificirati manje zastupljene fosforilirane ili u manjoj mjeri fosforilirane proteine, kao ni odrediti mjesta fosforilacije na proteinima<sup>10</sup>. Od 2007. godine, razvoj spektrometrije masa visoke rezolucije u kombinaciji s metodom bez gela doveo je do objavljivanja specifičnih STY bakterijskih fosfoproteoma za veliki broj vrsta bakterija<sup>100</sup>.

Trenutne globalne fosfoproteomske studije identificiraju desetke tisuća mjesta fosforilacije kod eukariota. Nasuprot tome, fosforilacija proteina je mnogo manje zastupljena kod prokariota, što analizu bakterijskih fosfoproteoma čini izazovnim zadatkom. Unatoč tome što taj broj raste svakom novom studijom, čak i najveći bakterijski fosfoproteomi su 10-100 puta manji nego eukariotski<sup>10</sup>.

Trenutno najveća baza podataka o fosfoproteomu prokariota, dbPSP (engl. *database of Protein Phosphorylation Sites in Prokaryotes*) sadrži 19 296 eksperimentalno identificiranih mjesta fosforilacije u 8 586 proteina iz 200 mikroorganizama koji pripadaju 12 taksonomskih skupina unutar domena bakterija i arheja. Ovi proteini su uključeni u različite stanične procese, kao što su dioba stanice, bazični metabolizam, sekundarni metabolizam, regulacija ekspresije gena, odgovor na stres i mnogi drugi.

Prvi objavljeni fosfoproteomi kod bakterija su bili iz modelnih bakterija *B. subtilis* i *E. coli*, s otprilike 100 fosforiliranih proteina po stanici<sup>18,19</sup>. Od tada su istraživanja uglavnom usmjerena na patogene vrste<sup>20</sup> (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*,

*Staphylococcus aureus*, *Chlamydia caviae* itd.). Što se tiče izučavanja fizioloških uloga fosforilacije na S/T/Y, do sada je najbolje proučavana bakterija *Mycobacterium tuberculosis*, u kojoj je dosad identificirano otprilike 500 fosforiliranih mjesta u oko 300 različitih proteina<sup>101,13,102,103</sup>. U kontekstu industrijski važnih bakterija, identificirano je samo nekoliko fosfoproteoma, npr. *Corynebacterium glutamicum* koji proizvodi glutamat<sup>21</sup>, *Lactococcus lactis* koja je od široke upotrebe u prehrambenoj industriji<sup>22</sup> i *Saccharopolyspora erythraea* aktinobakterija koja proizvodi eritromicin<sup>23</sup>. Prema revijalnom radu iz 2020. godine, najmanji fosfoproteomi su identificirani u bakteriji roda *Leptospira interrogans* s 27 i *Pseudomonas aeruginosa* s 59 mjesta fosforilacije, dok je u *E. coli* identificirano čak 2509 mjesta fosforilacije na 1133 proteina<sup>20</sup>. Osim navedenih vrsta bakterija, identificirani su i fosfoproteomi sljedećih vrsta: *Clostridium acetobutylicum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Halobacterium salinarum*, *Thermus thermophilus*, *Synechocystis sp.*, *Zymomonas mobilis*, *Sinorhizobium meliloti* itd.

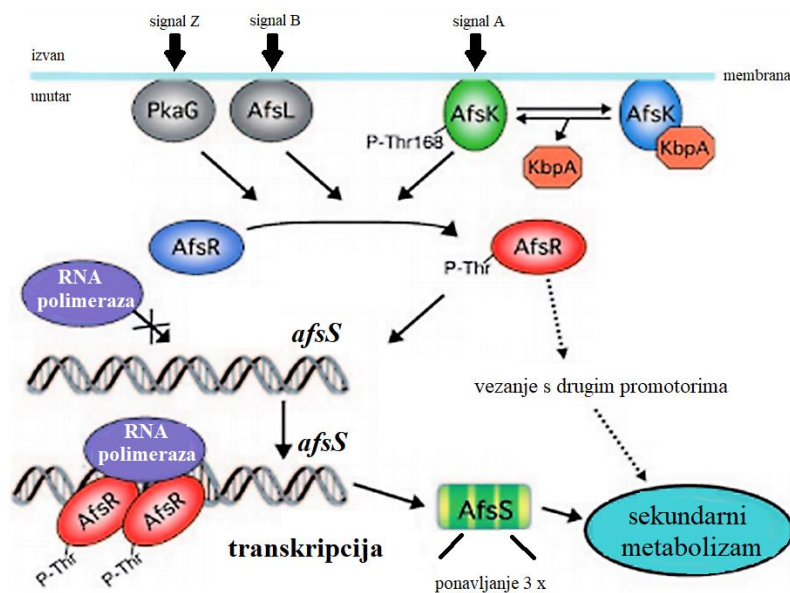
Unutar roda *Streptomyces*, jedino su na modelnoj vrsti *S. coelicolor* koja ne proizvodi komercijalni antibiotik, napravljena opsežna istraživanja fosfoproteoma. Prva globalna studija fosfoproteoma bakterije *S. coelicolor* otkrila je 46 novih mjesta fosforilacije na 40 proteina identificiranih tijekom srednje ekspanzijske faze rasta bakterije uzgajane u tekućoj kulturi<sup>24</sup>. Opsežna analiza fosfoproteoma tijekom diferencijacije bakterije *S. coelicolor* u čvrstom stanju identificirala je 127 fosfoproteina s 289 mjesta fosforilacije. Veliki broj novih fosfoproteina uključivao je faktore sporulacije, regulatore transkripcije, protein kinaze i druge regulatorne proteine uključene u morfološku diferencijaciju<sup>25</sup>. U najnovijoj kvantitativnoj studiji fosfoproteoma bakterije *S. coelicolor* je pokazano da je od 85 detektiranih fosforiliranih mjesta 58 diferencijalno eksprimirano tijekom staničnog rasta, među kojima je i nekoliko regulatora stanične diferencijacije i biosinteze aktinorodina<sup>26</sup>, što sugerira na ulogu fosforilacije u proizvodnji sekundarnih metabolita.

#### 2.3.4. Istraživanja uloge fosforilacije proteina kod bakterija

Iako je ovaj tip fosforilacije učestao kod bakterija, za samo mali broj proteina je razjašnjena biološka uloga njihove fosforilacije. Istraživanja napravljena u prva dva desetljeća nakon početka razvoja spektrometrije masa visoke rezolucije bila su usmjerena na otkrivanje fosforiliranih proteina i mjesta fosforilacije. U novije vrijeme više se pozornosti posvećuje istraživanju uloga identificiranih fosforilacija. Pokazalo se da je ekspresija gena posredovana

ST protein kinazama ključna za različite stanične procese, kao što su rast bakterija, dioba i morfologija stanica, transport željeza, proizvodnja sekundarnih metabolita, otpornost na antibiotike, virulencija i interakcije s biljkama.

Jedan od prvih poznatih primjera fosforilacije proteina koji dovodi do biosinteze antibiotika je AfsR/AfsK/AfsS sustav u modelnoj bakteriji *S. coelicolor* A3. Regulatorna kaskada započinje primanjem okolišnih signala koji potiču aktivaciju kinazne aktivnosti proteina AfsK, pri čemu dolazi do autofosforilacije na serinu i treoninu. Supstrat ovog proteina je transkripcijski regulator AfsR. Fosforilirani AfsR aktivira transkripciju gena *afsS*, a kao produkt nastaje protein AfsS koji aktivira transkripciju gena uključenih u biosintezu aktinorodina<sup>104</sup>. Uz AfsR, zna se da postoje još dvije kinaze koje mogu fosforilirati AfsR: PkaG i AfsL. Protein KbpA služi kao represor AfsK budući da se veže na katalitičko mjesto nefosforilirane forme kinaze, sprječavajući autofosforilaciju i samim time prijenos signala na ciljni protein.



**Slika 11.** AfsK/AfsR/AfsS sustav. Preuzeto i prilagođeno iz<sup>105</sup>.

Za kinazu AfsK također je pronađeno da regulira polarni rast i grananje hifa kod streptomiceta. Naime, pokazano je da ova kinaza lokalizira na vrhovima hifa i fosforilira esencijalni protein polarisoma koji usmjerava apikalni rast hifa streptomiceta, DivIVA (spomenut u 2.1.2.). Tijekom normalnog rasta bakterije, AfsK regulira grananje hifa modulirajući odabir mjesta grananja i rast polarisoma, što je pokazano u mutantu s deletiranim genom *afsk*, gdje se grananje



hifa događalo na mjestima udaljenim od vrhova hifa u usporedbi s divljim tipom. Također, sugerirano je da je ovo mehanizam kojim dolazi do rastavljanja aparata za apikalni rast na hifama koje se susreću s problemima sa sintezom staničnog zida. Naime, AfsK se aktivira signalima dobivenim zaustavljanjem sinteze stanične stijenke i hiperfosforilira DivIVA. Indukcija visokih razina fosforilacije DivIVA korištenjem konstitutivno aktivnog mutanta AfsK uzrokuje rastavljanje apikalnih polarisoma, ali i stimulira razvoj više novih polarisoma i novih mjesta grananja hifa. Ukupno, dokazano je da aktivnost AfsK kinaze ima jake učinke na polaritet stanica, proširenje vrha, substaničnu lokalizaciju DivIVA i pokretanje novih hifnih grana<sup>40</sup>.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Popis osnovnih kemikalija korištenih u radu.

Ime kemikalije	Proizvođač
albumin seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumine</i> , BSA)	Serva
amonijev bikarbonat (ABC)	Fluka
acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich
agar	Biolab
akrilamid/bisakrilamid	Biorad
amonijak, 25% (NH <sub>4</sub> OH)	Sigma-Aldrich
amonijev nitrat (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	Lach-ner
amonijev sulfat (APS)	Merck
Bradford reagens	BioRad
cijanoborhidrid (NaBH <sub>3</sub> CN)	Sigma-Aldrich
cijanoborodeuterid (NaBD <sub>3</sub> CN)	Sigma-Aldrich
cinkov sulfat heptahidrat (ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O)	Kemika
D-(+)-glukoza	Kemika
ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent kit	Thermo Scientific
etanol, 96%	Kemika
etanol, apsolutni	Carlo Erba
formaldehid (CH <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
formaldehid, deuterirani (CD <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
formaldehid, <sup>13</sup> C-obilježeni ( <sup>13</sup> CD <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
mravlja kiselina (engl. <i>formic acid</i> , FA)	Fisher chemicals
glicerol	Kemika
glicerol-2-fosfat (C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> P)	Sigma-Aldrich
glicin	Sigma-Aldrich
jodoacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich
imidazol	Merck
izopropanol	Sigma-Aldrich
kalcijev karbonat (CaCO <sub>3</sub> )	Kemika
kalcijev nitrat tetrahidrat (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O)	Lach-ner
kalijev klorid (KCl)	Kemika
kloroform	Kemika
kvašćev ekstrakt	Sigma-Aldrich

laktalbumin hidrolat	Becton, Dickinson and Company (BD)
magnezijev sulfat heptahidrat ( $Mg(SO_4)_2 \times 7H_2O$ )	Kemika
manitol	Merck
metanol	Kemika
MOPS (engl. <i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i> )	Santa cruz
natrij-dodecil sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
natrijev fluorid (NaF)	Sigma-Aldrich
natrijev klorid (NaCl)	Kemika
natrijev nitrat ( $NaNO_3$ )	Lach-ner
natrijev ortovanadat ( $Na_3VO_4$ )	Sigma-Aldrich
natrijev pirofosfat ( $Na_4P_2O_7$ )	Sigma-Aldrich
natrijev tartarat ( $C_4H_4Na_2O_6$ )	Sigma-Aldrich
N-oktil- $\beta$ -D-glukopiranozid	Roth
octena kiselina (ledena)	Kemika
oksitetraciklin (OTC)	Sigma-Aldrich
pepton	Sigma-Aldrich
PhastGel®Blue R	Sigma-Aldrich
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher
fenilmetilsulfonil fluorid (engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> , PMSF)	Sigma-Aldrich
saharaza	Kemika
soja brašno	Sigma-Aldrich
TEMED (N,N,N,N-tetrametiletildiamin)	Sigma-Aldrich
tri-fluoro-octena kiselina (engl. <i>trifluoroacetic acid</i> , TFA)	Fisher chemicals
tiourea	Sigma-Aldrich
tris baza	Sigma-Aldrich
TSB (engl. <i>tryptic soya broth</i> )	Becton, Dickinson and Company (BD)
Tween-20	Sigma-Aldrich
urea	Sigma-Aldrich

### 3.1.2. Materijali

Materijali korišteni su radu su navedeni u Tablici 2.

**Tablica 2.** Popis materijala korištenih u radu.

Materijal	Proizvođač
3M C8/C18 ekstrakcijski diskovi čvrste faze	Empore™
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare

zrnca titanij dioksida (TiO <sub>2</sub> ), 300 Å, 5 µm	ZirChrom
filteri za sterilizaciju	Sartorius
grafit	Sigma-Aldrich
membrane za dijalizu	Roth
membranski filteri	Sartorius
prazne kolone	Biorad
membrana PVDF	Thermo Fisher
kolone Sep-Pak Vac 1cc C18	Waters

### 3.1.3. Otopine i puferi

Osnovne otopine i puferi i načini njihove pripreme navedeni su Tablici 3.

**Tablica 3.** Popis otopina i pufera korištenih u radu.

Otopine	Sastav
boja za proteine (4x SB; engl. <i>sample buffer</i> )	200 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 400 mM DTT, 8% SDS, 0,04% bromfenol plavo, 40% glicerol
otapalo A	0,1% FA
otapalo A*	2% ACN, 1% FA
otapalo B	0,1 FA, 80% ACN
pufer za denaturaciju	6 M urea, 2 M tiourea, 10 mM Tris, pH 8,0
pufer za lizu	50 mM Tris HCl pH 7,7, 5 mM glicerol 2-fosfat, 5 mM natrijev fluorid, 5 mM natrijev pirofosfat, 1 mM natrijev ortovanadat
pufer za odbojavanje	10% octena kiselina i 10% izopropanol
pufer za prijenos	25 mM TRIS-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol
pufer za SDS-PAGE	30,3 g/L TRIS, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS
pufer za sonikaciju	pufer za lizu s dodatkom 5 mM imidazola i 5 mM natrijevog tartarata
TBST 1x	50 mM TRIS (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20

#### 3.1.4. Molekularni biljezi

Molekularni biljezi za određivanje mase proteina su prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4.** Popis molekularnih biljega korištenih u radu.

Biljeg	Proizvođač
Proteinski biljeg za određivanje mase proteina	Biorad
Obojani proteinski biljeg za određivanje mase proteina	Biorad

### 3.1.5. Enzimi

Enzimi su navedeni u Tablici 5.

**Tablica 5.** Popis enzima korištenih u radu.

Enzimi	Proizvođač
benzonaza	Sigma
endoproteinaza Lys-C	Wako
tripsin	Promega

### 3.1.6. Antitijela

Antitijela su navedena u Tablici 6.

**Tablica 6.** Popis antitijela korištenih u radu.

Antitijelo	Proizvođač
ab15556 (engl. <i>anti-phosphoserine/threonine/tyrosine antibody</i> )	abcam
4G10 (engl. <i>anti-phosphotyrosine antibody</i> )	Merck
sekundarno antitijelo iz miša (engl. <i>anti-mouse secondary antibodies</i> )	GE Healthcare

### 3.1.7. Uređaji

Uređaji su navedeni u Tablici 7.

**Tablica 7.** Popis uređaja korištenih u radu.

Model	Proizvođač
Agilent 1200 HPLC Series	Agilent Technologies

analitička vaga	Sartorius—BP160P
centrifuga MULTIFUGE 3 S-R	Heraeus
centrifuga za <i>StageTip</i>	Sonation
grijač kolone	Sonation
ionski izvor (engl. <i>Electrospray Ionization Source, ESI</i> )	Proxeon Biosystems
izvor napajanja za elektroforezu proteina i transfer PowerPac™ Basic	Bio-Rad
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Aura-VF48
kadica za elektroforezu i transfer proteina Mini-PROTEAN®Tetra System	Bio-Rad
Mala stolna i brza centrifuga s hlađenjem 5415R	Eppendorf
Nano ES Ion Source (ES380)	Thermo Scientific
Shaking Incubator	Shel Lab
sistem za filtraciju	Sartorius
spektrofotometar Ultrospec 2100 pro UV/Visible	Amersham Biosciences
spektrometar masa LTQ-Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific
spektrometar masa Q Exactive HF	Thermo Fisher Scientific
sustav EASY-nLC II	Proxeon Biosystems
termoblok Thermomixer comfort	Eppendorf
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom Ultrasonic Processor	Cole-Parmer
uređaj za ugušćivanje uzoraka (SpeedVac)	Eppendorf
vorteks REAX top	Heidolph
zračni inkubator s tresilicom Innova®40	New Brunswick Scientific
zračni inkubator s tresilicom Innova™4300	New Brunswick Scientific

### 3.2. Mikroorganizmi

Korišteni su različiti sojevi bakterije *S. rimosus* (Tablica 8) i bakterija *Bacillus subtilis*.

**Tablica 8.** Popis mikroorganizama korištenih u radu.

Ime soja	Vrsta soja
<i>S. rimosus</i> G7	divlji tip
<i>S. rimosus</i> 23383	mutirani soj
<i>S. rimosus</i> R7	divlji tip
<i>S. rimosus</i> R6	mutirani soj
<i>S. rimosus</i> M4018	mutirani soj

<i>S. rimosus</i> 554RED	mutirani soj
<i>B. subtilis</i> M168	divlji tip

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Uzgoj mikroorganizama

Sojevi bakterije *S. rimosus* uzgajani su u tekućem mediju optimiziranom za laboratorijsku proizvodnju OTC-a (TSM5 - Tablica 9) na 30°C i 250 o/min, a prije inokulacije su uzgajani u "SEED" mediju. Bakterija *B. subtilis* je uzgajana u standardnom LB mediju na 37°C. Ako nije drugačije navedeno, pri uzgoju i manipulaciji mikroorganizama upotrijebljene su standardne tehnike<sup>37</sup>.

**Tablica 9.** Hranjive podloge za uzgoj bakterije *S. rimosus*.

Naziv podloge	Vrsta podloge	Sastav	Namjena
SEED	tekuća	10 g D-glukoze, 5 g ekstrakta kvasca, 15 g hidrolizata laktalbumina, 2,8 g saharoze i 1 g CaCO <sub>3</sub> po 1L	predkultivacija
TSM5	tekuća	50 g glukoze, 10 g sojinog peptona, 7 g MOPS pufera / slobodne kiseline, 2 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 2 g NaNO <sub>3</sub> , 50 mg NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 50 mg KCl, 40 mg MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 20 mg ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; pH je podešen na 7,2 pomoću NaOH	proizvodnja OTC-a
LB	tekuća	5 g NaCl, 2,5 g kvašćev ekstrakt, 5 g tripton po 500 mL	kultivacija bakterije <i>B. subtilis</i>
TSA (engl. <i>tryptic soya agar</i> )	kruta	15 g TSB, 8 g agar po 500 mL	brzi nesporulirajući rast
MSA (engl. <i>soya mannitol agar</i> )	kruta	20 g soja brašno, 20 g manitol, 20 g agar po 1 L	rast i sporulacija
LB	kruta	5 g NaCl, 2,5 g kvašćev ekstrakt, 5 g tripton, 7,5 g agar po 500 mL	provjera kontaminacije, antibiogram



Inokulum za sve naredne eksperimente dobiven je iz suspenzije spora ( $10^{10}$ /ml) pohranjenih u 20% (v/v) glicerola na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Svježa biomasa dobivena u obliku kratkih i malih fragmenata micelija nakon 24h uzgoja je sakupljena, mehanički usitnjena ručnim homogenizatorom i isprana te je pripremljena gusta suspenzija u 20% (v/v) glicerolu i pohranjena na  $-20^{\circ}\text{C}$  za sve naknadne eksperimente uzgoja. Predkultivacija je provedena preko noći (do 30h uzgoja) u 15 ml "SEED" medija inokuliranog s 2% (v/v) guste mlade suspenzije biomase za naknadnu kultivaciju u mediju TSM5 za proizvodnju OTC-a. Kako bi se postigla dobra aeracija, 300 ml ovog medija (u tikvici od 2 L) je inokulirano s 1% (v/v) suspenzijom biomase dobivenom iz "SEED" medija i inkubirano na  $30^{\circ}\text{C}$  i 250 o/min do 120h. Za provjeru reproducibilnosti rasta bakterije su uzgajane uvijek u tri biološka replikata.

### 3.3.2. Mjerenje suhe biomase

Uzorci kulture za izradu krivulje rasta, kao i uzorci za Western blot i proizvodnju OTC-a, uzimani su (2 ml) svaka 2-3 sata tijekom ranih do srednjih eksponencijalnih i kasnih eksponencijalnih do ranih stacionarnih faza rasta. S ulaskom *S. rimosus* u stacionarnu fazu, kada je rast počeo stagnirati, uzorkovanje je smanjeno na svakih 6 sati. Rast bakterija kvantificiran je mjerenjem suhe stanične biomase pomoću vakuuskog filtracijskog sustava na membranskom filteru od  $0,45\ \mu\text{m}$  (Sartorius) korištenjem tehnike mikrovalnog sušenja (2 min pri visokoj snazi). Sakupljeni uzorci kultura su centrifugirani 5 min na 4500 o/min, supernatant je pažljivo odbačen, a talog je resuspendiran u malom volumenu vode i prenesen na membranski filter. Nakon filtracije, membranski filteri su osušeni u mikrovalnoj pećnici tijekom 2 min (do prestanka fluktuiranja u masi) i izvagani.

### 3.3.3. Sakupljanje i liza stanica

Uzorci kulture za analizu (fosfo)proteoma uzimani su u tri odabrane vremenske točke: (i) tijekom eksponencijalne faze, tijekom koje se može primijetiti zaustavljanje rasta, (ii) u kasnoj eksponencijalnoj fazi, kada dolazi do prijelaza između eksponencijalne i stacionarne faze i (iii) u kasnoj stacionarnoj fazi. Ovisno o fazi rasti, sakupljano je od 100 ml - 250 ml kulture (~500 mg biomase/uzorak). Uzete kulture su oborene centrifugiranjem na 4500 o/min tijekom 10 min, isprane dvaput u 10 ml pufera za lizu obogaćenog s inhibitorima fosfataza (Tablica 3) i

resuspendiranog u nekoliko ml (50 mg/ml) pufera za sonikaciju (Tablica 3). Liza stanica provedena je zamrzavanjem uzoraka u tekućem dušiku, brzim odmrzavanjem pod vodom i kuhanjem 5 min. PMSF, inhibitor serinskih proteaza, dodan je nakon hlađenja na ledu do konačne koncentracije od 0,5 mM, a potom su stanične stijenke razbijene primjenom ultrazvučnih valova s amplitudom 40% maksimalne vrijednosti koja se može postići na sonikatoru „Ultrasonic processor (Cole–Parmer)” na ledu. Stanice su razbijane ukupno 4 min, uz prekide od 20 sek između soniciranja i neprekidno su hlađene u ledu. U lizat su dodani benzonaza (25 U/ml) i N-oktilglukozid (1%), a zatim je smjesa inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Netopljivi stanični ostatci su odbačeni nakon centrifugiranja na 13 000 o/min tijekom 30 min, a proteini u supernatantu su dijalizirani prema redestiliranoj vodi uz 3-4 promjene vode te istaloženi prema metodi opisanoj u sljedećem odlomku i pohranjeni na -80°C.

#### 3.3.4. Taloženje proteina pomoću metanola i kloroforma

Proteini su istaloženi standardnim postupkom ekstrakcije metanolom i kloroformom. Otopini proteina je dodano četiri volumena metanola. Smjesa je promiješana vorteksiranjem 10 sek, a zatim je dodan jednak volumen kloroforma i smjesa je još jednom promiješana vorteksiranjem 10 sek. Na kraju je dodano još tri volumena redestilirane vode i smjesa je vorteksirana 10 sek. Smjesa je inkubirana na ledu 10-30 min dok se nije počela formirati interfaza između gornje vodene i donje organske faze, a zatim je centrifugirana 10 min na 8000 o/min. Pažljivo je uklonjena gornja faza da se ne dotakne međusloj proteina, zatim je dodano još četiri volumena metanola za dodatno ispiranje, a smjesa je promiješana vorteksiranjem i centrifugirana 10 min na 8000 o/min. Metanol je uklonjen, a talog proteina je osušen na zraku. Istaloženi proteini su otopljeni u minimalnoj količini pufera za denaturaciju (Tablica 3), a koncentracija im je određena metodom po Bradfordu opisanoj u sljedećem odlomku.

#### 3.3.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina su određene metodom po Bradfordu 1976 uz upotrebu Bradfordovog reagensa i komercijalnog kompleta za određivanje koncentracije proteina (Quick Start Bradford Protein Assay Kit, Bio-Rad). Ova metoda temelji se na reakciji proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250 pri čemu se apsorpcijski maksimum boje pomiče s 465 nm na 595 nm.

Apsorbancija smjese je pri valnoj duljini od 595 nm u određenom rasponu linearno proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku. Svi uzorci su razrijeđeni u destiliranoj vodi do konačnog volumena od 100  $\mu$ L i dodano im je po 1 mL Bradfordovog reagensa. Za svaki uzorak mjerenja su napravljena u triplikatima na spektrofotometru pri valnoj duljini 595 nm nakon 10 min inkubacije s Bradfordovim reagensom, a koncentracija je određena usporedbom sa baždarnom krivuljom izrađenom za komercijalne standarde BSA poznatih koncentracija (Biorad). Pomoću dobivene jednadžbe pravca iz baždarne krivulje, određene su koncentracije proteina iz staničnog lizata.

### 3.3.6. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima SDS-PAGE

Proteini su razdvajani pomoću jednodimenzionalne diskontinuirane elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) sustavom za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III (BioRad) pri sobnoj temperaturi. Gel za SDS-PAGE se sastoji od gornjeg gela za sabijanje (5% akrilamid:bisakrilamid 29:1, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,1% TEMED) i donjeg gela za razdvajanje (12% akrilamid:bisakrilamid 29:1, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,1% TEMED). Prvo se izlije donji gel, a na njegovu površinu nadsloji izopropanol (ili voda) radi sprječavanja interakcije s atmosferskim kisikom. Nakon polimerizacije se izopropanol (ili voda) odlije te se izlije gornji gel. Prije nanošenja na gel, u uzorke je dodan pufer s bojom (4xSB) (Tablica 3) te su uzorci denaturirani inkubacijom 5 min pri 95°C. Na gel je dodan i proteinski biljag za određivanje veličine proteina (Tablica 4). Elektroforeza se odvijala pri naponu struje od 150 V do sabijanja uzoraka, a zatim je pojačana na 180 V dok boja ne bi dostigla kraj gela. Proteini su vizualizirani inkubacijom gela u boji Coomassie briljant plavo (engl. *Coomassie Brilliant Blue*, CBB) uz potresanje tijekom 15-20 min, te odbojavanjem gela u puferu za odbojavanje (Tablica 3).

### 3.3.7. Western blot

Nakon završene elektroforeze, proteini su preneseni na PVDF membranu veličine pora 0,45  $\mu$ m u puferu za prijenos (Tablica 3) tijekom 90 min pri konstantom naponu od 100 V na ledu pomoću sustava za prijenos proteina (Bio-Rad). Nakon prijenosa proteina, membrane su

blokirane u 3% BSA u puferu TBST (Tablica 3) tijekom 60 min uz lagano treskanje. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane s primarnim antitijelima tijekom 120 min uz lagano treskanje. Korištena su ab15556 antitijela (Tablica 6) za detekciju S/T/Y fosforilacije (razr. 1:2000) i 4G10 antitijela (Tablica 6) za detekciju Y fosforilacije (razr. 1:200). Membrane su isprane 3 x 5 min u puferu TBST, nakon čega su inkubirane sa sekundarnim antitijelima dobivenim iz miša vezanim na peroksidazu tijekom 60 min uz lagano potresanje (razr. 1:10 000). Membrane su na kraju isprane 3 x 10 min u puferu TBST. Za detekciju signala na membrani korišten je komplet za kemiluminiscenciju (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). Kemiluminiscentni signali detektirani su u tamnoj komori na filmu „Amersham Hyperfilm ECL” (GE Healthcare), razvijanjem pomoću razvijачa i fiksira (AGFA G138i developer, AGFA G338 fixer).

### 3.3.8. Testiranje aktivnosti i koncentracije antibiotika

Proizvodnja OTC-a je ispitana kvalitativno metodom izbušenih rupica u agaru i kvantitativno metodom HPLC (visokotlačna tekućinska kromatografija) iz supernatanta sakupljenih tijekom različitih faza rasta sojeva bakterije *S. rimosus*.

#### 3.3.8.1. Određivanje proizvodnje OTC-a metodom izbušenih rupica u agaru

Proizvodnja OTC-a određena je metodom difuzije u jažici u agaru korištenjem soja *B. subtilis* M168 (divlji tip) osjetljivog na OTC. Na LB ploču je naciepljena prekonoćna kultura *B. subtilis*, a potom su na njoj izbušene rupice promjera 10 mm. U rupice su naneseni supernatanti bakterija sakupljeni u različitim fazama rasta. Ploča je inkubirana 16-18h pri 37°C, a pojava zone inhibicije indicirala je proizvodnju antibiotika.

#### 3.3.8.2. Određivanje koncentracije OTC-a pomoću HPLC-a

Proizvodnja OTC-a u odabranim fazama rasta kvantificirana je HPLC-om. Supernatanti kulture (900 µl) su zakiseljeni s 0,1 M HCl (100 µl), inkubirani 30 min i filtrirani kroz PTFE (engl. *polytetrafluoroethylene*) filter od 0,45 µm. Nakon toga, 30 µl uzorka je analizirano pomoću sustava Agilent 1200 HPLC. Kromatografsko odvajanje izvedeno je na Waters Symmetry C18

koloni (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) korištenjem eluiranja u gradijentu (A) 0,1% mravlje kiseline u vodi i (B) acetonitrila kako slijedi: 0–60 min, 10–90% B; 60–65 min, 90% B; 65,1–70 min 10% B; pri brzini protoka od 0,5 ml/min. Temperatura stupca održavana je na 30°C. Standardna krivulja je izrađena korištenjem različitih koncentracija (1–100 µg/ml) standarda OTC-a. Svi uzorci su praćeni na sljedećim valnim duljinama: 260, 266, 270, 320, 350, 365 i 370 nm, a OTC je detektiran na 266 nm. Kromatografski podaci analizirani su pomoću softvera EZChrom Elite (Agilent Technologies, Njemačka).

### 3.3.9. Razgradnja proteina na peptide u otopini

Nakon mjerenja koncentracije, 1–6 mg (ovisno o eksperimentu) proteina otopljenih u puferu za denaturaciju je odvojeno za razgradnju na peptide. Proteini su reducirani ditiotreitolum (1 M DTT je pripremljen u otopini amonijevog bikarbonata koncentracije 50 mM) do konačne množinske koncentracije 1 mM, tijekom 1h (pri 25°C, uz potresanje 550 o/min). Kako bi se spriječilo ponovno stvaranje disulfidnih veza, reducirani cisteini su prevedeni u karbamidometilirani oblik dodatkom alkilacijskog pufera s jodoacetamidom (550 mM IAA je pripremljen u otopini amonijevog bikarbonata koncentracije 50 mM) do konačne množinske koncentracije 5,5 mM. Uzorci su, zbog fotoosjetljivosti IAA, prekriveni aluminijskom folijom i inkubirani 1h pri 25°C uz potresanje 550 o/min. U uzorke proteina je potom dodana endoproteinaza Lys-C (1:100, w/w), koja cijepa na lizinskim aminokiselinskim ostacima, a smjesa je inkubirana 3h. Smjesa je potom razrijeđena s četiri volumena 20 mM amonijevog bikarbonata. Prije dodatka tripsina, provjeren je pH i po potrebi podešen na pH 8 (optimalan pH za rad tripsina). Tripsin je dodan u omjeru 1:100 (w/w), a smjesa s tripsinom je inkubirana preko noći na 550 o/min pri 25°C. Reakcija je zaustavljena zakiseljavanjem s trifluorooctenom kiselinom (TFA) do pH < 3.

Alikvot od 10 µg pročišćen je pomoću *StageTip*-ova (vidi dolje), a 2 µg je korišteno za izravno kvalitativno mjerenje proteoma.

### 3.3.10. Priprema tzv. *StageTip*-ova i pročišćavanje peptida

Prije svakog nanošenja na LC-MS/MS, sve smjese peptida su odsoljene i pročišćene na kromatografskom materijalu C18 pomoću ručno pripremljenih tzv. *StageTip*-ova<sup>106</sup>. *StageTip* se napravi tako da se u plastični nastavak za pipetu volumena 200 µl umetnu 2 diska Empore™ C18 materijala pomoću metalne cjevčice. Prije nanošenja uzorka, C18 diskovi obrnute faze aktivirani su dodatkom metanola (100 µl), nakon čega je otopina propuštena centrifugiranjem u improviziranoj centrifugi za obaranje uzoraka (*TOMY*). Zatim je *StageTip* uravnotežen s 200 µl otapala A\* (Tablica 3), pri čemu je posebna pozornost posvećena tome da se *StageTip* ne posuši prije nanošenja uzorka. Naneseno je do 10 µg peptida, nakon čega je *StageTip* ispran s 200 µl otapala A (Tablica 3). Nakon ovog koraka *StageTip*-ovi su spremljeni na +4°C do korištenja, ukoliko se nisu odmah analizirali. Prije nanošenja na MS, peptidi su eluirani s 50 µl otapala B (Tablica 3) i ukoncentrirani u Speed Vacu do otprilike 5 µl volumena. Volumen uzorka je podešen do 20 µl ukupnog volumena s otapalom A i konačnim 10% (v/v) otapala A\* te su uzorci nanoseni u mikrotitarsku pločicu nano-HPLC-a.

### 3.3.11. Pročišćavanje proteina na grafitnoj koloni

Za odstranjivanje pigmenta koji proizvodi soj *S. rimosus* 23383 korištene su kolone s grafitom. Kolona se pripremi tako da se odvagane grafit (100 mg grafita/1 mg proteina) i resuspendira u vodi (1 mg grafita u 1 ml vode). Na dno kolone se stavi filter, a na filter smjesa grafita i vode, nakon čega slijedi centrifugiranje na 2000 g tijekom 5 min. Zatim se doda 1 ml NH<sub>4</sub>OH (1M) i centrifugira na 2000 g tijekom 3 min. Ovaj postupak se ponovi 3x ili dok grafitne čestice ne prestanu izlaziti. U sljedećem se koraku doda 1 ml acetonitrila (ACN), kojim se kolona aktivira i ponovo centrifugira na 2000 g tijekom 3 min (2x). Zatim se doda 1 ml 1%-tne (v/v) tri-fluorooctene kiseline (TFA) i centrifugira na 2000 g tijekom 3 min (2x), čime se ekvilibrira kolona. Prije nanošenja na kolonu, uzorak peptida je potrebno zakiseliti miješanjem s 2,5 % (v/v) TFA u omjeru 1:1. Nakon nanošenja uzorka na kolonu, smjesa peptida se propušta tijekom 10 min kroz kolonu kako bi se peptidi što bolje vezali, a postupak se ponovi dva puta. Nevezana frakcija se također sačuva ukoliko je bezbojna. Kolona se ispere 2x s 1 ml 1% (v/v) TFA. Peptidi se eluiraju s kolone 2x s 500 µl otopine mravlje kiseline (FA) sastava 0,1% (v/v) u 80% (v/v) ACN, a zatim s još 500 µl ACN (100%) u istu tubicu. Nakon eluiranja, uzorci se pomiješaju s frakcijom "flow-through" i ukoncentriraju u Speed Vac-u do volumena od 100 µl.

### 3.3.12. Dimetilno obilježavanje proteina stabilnim izotopima (engl. *stable-isotope dimethyl labelling*)

Za kvantitativne analize, korištena je metoda obilježavanja peptida dobivenih iz različitih faza rasta bakterije stabilnim izotopima, pri čemu se svi primarni amini peptida (N-terminalni krajevi i postrani lanci lizinskih ostataka) prevode u dimetilamine<sup>107</sup>. Koristeći kombinacije nekoliko izotopomera formaldehida i cijanoborhidrida, mogu se dobiti peptidi različite mase. Kombinacija običnog formaldehida (CH<sub>2</sub>O) i cijanoborhidrida (NaBH<sub>3</sub>CN) stvara povećanje mase od 28 Da (oznaka "laki"), dok korištenje deuteriranog formaldehida (CD<sub>2</sub>O) stvara povećanje mase od 32 Da po primarnom aminu (oznaka "srednje teški"). Povećanje mase od 36 Da se može postići kombiniranjem deuteriranog i <sup>13</sup>C-obilježenog formaldehida (<sup>13</sup>CD<sub>2</sub>O) s cijanoborodeuteridom (NaBD<sub>3</sub>CN) (oznaka "teški").

#### 3.2.12.1. Priprema izotopno obilježenih reagensa

Reagensi obilježeni izotopima su pripremljeni prema Tablici 10. Otopine NaBH<sub>3</sub>CN i NaBD<sub>3</sub>CN su pripremljene otapanjem odvagane krutine u vodi dugo vorteksirajući, nakon čega su centrifugirane na 13 000 o/min kako bi se neotopljeni dijelovi odvojili od otopine. Otopine su potom dodane u prethodno pripremljene smjese fosfatnog pufera (pH 7,5) i različitih izotopomera formaldehida.

**Tablica 10.** Sastav reagensa obilježenih izotopima

Oznaka	Sastav
"Laki" (L)	2,25 ml fosfatni pufer pH 7,5 125 µl 4% CH <sub>2</sub> O (37% v/v) 125 µl 0,6 M NaBH <sub>3</sub> CN
"Srednje teški" (M)	2,25 ml fosfatni pufer pH 7,5 125 µl 4% CD <sub>2</sub> O (20% v/v) 125 µl 0,6 M NaBH <sub>3</sub> CN
"Teški" (H)	2,25 ml fosfatni pufer pH 7,5 125 µl 4% <sup>13</sup> CD <sub>2</sub> O (20% v/v)

	125 µl 0,6 M NaBD <sub>3</sub> CN
--	-----------------------------------

**Tablica 11.** Pregled svih kvantitativnih (i kvalitativnih) eksperimenata napravljenih u oba soja.

Soj	Eksperiment	Faze (x broj replikata)	Obilježavanje stabilnim izotopima
G7	<b>Eksperiment 1</b>	SI, SII, SIII (x3)	L – SI; M – SII; H - SIII
23383	<b>Eksperiment 1</b>	SI, SII, SIII (x3)	L – SI; M – SII; H - SIII
	<b>Eksperiment 2</b>	<b>A:</b> S0 (x1), SI (x2)	L – S0 (rep. 1); M – SI (rep.1); H – SI (rep. 2)
		<b>B:</b> S0 (x1), SI (x2)	Isti uzorci kao u eksp. 2A, samo bez grafita
		<b>C:</b> S0, SI (x1)	L – S0; H – SI
		<b>D:</b> SI, SII (x1)	L – SI; H – SII
	<b>Eksperiment 3</b>	SI (x1)	Samo kvalitativna analiza
		SII (x1)	

### 3.2.12.2. Postupak obilježavanja peptida

Obilježavanje peptida se provodi na kolonama Sep-Pak C18. Prvo je kolona aktivirana metanolom (500 µl) i ekvilibrirana s 2 x 1 ml otapala A (Tablica 3). Peptidi su nanjeni na kolonu i dvaput isprani s 1 ml otapala A. Potom je kroz kolonu propuššana svježe pripremljena smjesa izotopno obilježenih reagensa (Tablica 10) polagano tijekom najmanje 10 min, što se ponovi dva puta. Obilježeni peptidi su zatim dva puta isprani s 1 ml otapala A i eluirani s 1,8 ml otopine sastava 6% (v/v) TFA u 80% (v/v) ACN. Acetonitril je uklonjen iz eluata vakuumskim centrifugiranjem, a uzorci su pročišćeni korištenjem tzv. *StageTip*-ova (odlomak 3.3.10.).

### 3.3.13. Provjera ugradnje stabilnih izotopa i miješanja uzoraka

Ugradnja izotopa u peptide je određena na LC-MS/MS-u zasebnim mjerenjem "lakih", "srednje teških" i "teških" obilježenih uzoraka. Za to je 10 µg svakog uzorka odvojeno, pročišćeno preko tzv. *StageTip*-ova (vidi 3.3.10.) i izmjereno pomoću LC-MS/MS. Prije svakog LC-MS/MS mjerenja proteoma ili obogaćivanja fosfopeptidima za analizu fosfoproteoma, različito



obilježeni uzorci pomiješani su u jednakim omjerima (10 µg svakog) i podvrgnuti LC-MS/MS mjerenju radi provjere ispravnog miješanja uzoraka (engl. *mixing check*), a na temelju ove analize količine peptida u smjesi su po potrebi korigirane prije podvrgavanja glavnim kvantitativnim eksperimentima. Alikvot od 10 µg je iskorišten za analizu proteoma, a ostatak smjese peptida je podvrgnut obogaćivanju fosfopeptida.

#### 3.3.14. Obogaćivanje fosfopeptidima

Za obogaćivanje fosfopeptida je korištena afinitetna kromatografija s metalnim oksidom (TiO<sub>2</sub>). Ova metoda se temelji na visokom afinitetu metalnih iona za negativno nabijene fosfatne skupine, pri čemu može doći i do vezanja negativno nabijenih aminokiselinskih ostataka, kao što su glutamat i aspartat<sup>108</sup>. Da bi se ovo nespecifično vezanje izbjeglo, prilikom inkubacije se koristi jako zakiseljeni pufer, kako bi neutralizirao negativne aminokiselinske ostatke peptida. Prije inkubacije sa smjesom peptida, zrnca TiO<sub>2</sub> su isprana u 6% TFA u 80% ACN (na 1 mg zrnaca se dodaje 50 µl pufera). Obilježeni peptidi inkubirani su sa zrcima TiO<sub>2</sub> u omjeru 1:10 (kuglica:peptid) tijekom 10 min na rotacijskom kolu u 8-10 uzastopnih krugova. Fosfopeptidi su polagano eluirani u tri koraka, prvo s 30 µl 5% (v/v) amonijevog hidroksida u 20 µl 20% (v/v) TFA tijekom 15 min pri 1200 o/min. U drugom eluiranju, fosfopeptidi su eluirani sa 70 µl 20% (v/v) amonijevog hidroksida u 60% (v/v) acetonitrilu (pH 10,5). Konačno, fosfopeptidi su eluirani s 20 µl 60% ACN u 1% TFA. Acetonitril je uklonjen iz eluata vakuumskim centrifugiranjem, a uzorci su zakiseljeni s TFA do pH 2, ukoliko je potrebno, i pročišćeni pomoću tzv. *StageTip*-ova.

#### 3.3.15. Mjerenja LC-MS/MS

Eluirani peptidi su odvojeni EASY-nLC II sustavom spojenim s LTQ Orbitrap Exactive spektrometrom mase putem izvora elektroraspršenja. Za razdvajanje peptida, po 2 µL uzorka nanoseno je automatski na nano-HPLC kolonu duljine 20 cm i unutarnjeg promjera od 75 µm, s fuzioniranim česticama reverzne faze ReproSil-Pur C<sub>18</sub>-AQ od 1,9 µm. Temperatura kolone održavana je na 40°C korištenjem grijača integriranog u koloni. Peptidi su nanoseni na kolonu u otapalu A pri brzini protoka od 700 nl/min uz maksimalni protutlak od 500 bara. Eluiranje je trajalo 60 min (za analize fosfoproteoma) ili 120 min (za analize proteoma), pri čemu je korišten

gradijent 10-50 % otapala B u otapalu A, uz konstantnu brzinu protoka od 200 nl/min. Nakon gradijenta i elucije, kolona je isprana mobilnom fazom sastava 90% otapala B u otapalu A i ponovno uravnotežena otapalom A. Razdvojeni peptidi ionizirani su metodom elektroraspršenja (ESI, engl. *electrospray ion source*) s primijenjenim naponom 2,3 kV i temperaturom kapilare od 275°C. Sveobuhvatno skeniranje je imalo raspon m/z 300 – 1650 m/z pri ciljnoj vrijednosti od  $3 \times 10^6$  naboja s maksimalnim vremenom ubrizgavanja od 25 ms i razlučivosti od 60 000 (definirano na m/z 200). MS/MS spektri višeenergetske kolizijske disocijacije (HCD) detektirani su s maksimalnim vremenom ubrizgavanja od 45 ms ili 220 ms (za mjerenje fosforilacije) pri ciljnoj vrijednosti od  $1 \times 10^5$  i razlučivosti od 30 000 (u rasponu m/z 200) ili 60 000 za mjerenje fosfoproteoma. Normalizirana energija sudara postavljena je na 27%, a prag intenziteta je zadržan na  $1 \times 10^5$  ili  $5 \times 10^4$  za mjerenje fosfoproteoma. Mase sekvenciranih prekursorskih iona dinamički su isključene iz MS/MS fragmentacije tijekom 30 s. Ioni s pojedinačnim, nedodijeljenim ili šest ili većim nabojnim stanjima isključeni su iz odabira fragmentacije.

### 3.3.16. Analiza neobrađenih podataka

Svi neobrađeni podaci/spektri obrađeni su pomoću softverskog paketa MaxQuant, verzija 2.0.3.0. Sveukupno, 99 neobrađenih datoteka (engl. *raw files*) je procesirano, od čega je 77 pripadalo frakcijama obogaćenih fosfopeptida. Identificirani peptidi pretraženi su pomoću tražilice Andromeda<sup>109</sup> prema proteomu s kromosoma divljeg tipa G7 bakterije *S. rimosus* (NCBI, pristupni broj CP048261) i pridruženog mu plazmida (NCBI, pristupni broj CP048262), te datoteke koja sadrži 245 uobičajenih laboratorijskih kontaminanata. Postavljeno je dozvoljeno odstupanje u masi prekursor iona na 4,5 ppm. Korišteni su sljedeći parametri za pretraživanje proteoma: tripsin je odabran kao proteaza s dva dozvoljena propuštena cijepanja, karbamidometilacija cisteina postavljena je kao fiksna modifikacija, dok su oksidacija metionina, N-terminalna acetilacija i fosforilacija serina, treonina i tirozina definirane kao varijabilne modifikacije. Minimalna potrebna duljina peptida za kvantifikaciju postavljena je na sedam aminokiselina i minimalno dva kvantificirana peptida (engl. *ratio counts*) bila su potrebna za kvantifikaciju proteina. Prag tolerancije FDR (engl. *false discovery rate*) postavljen jer na 1% na razinama peptida, proteina i mjesta fosforilacije<sup>110</sup>.

### 3.3.17. Statističke analize

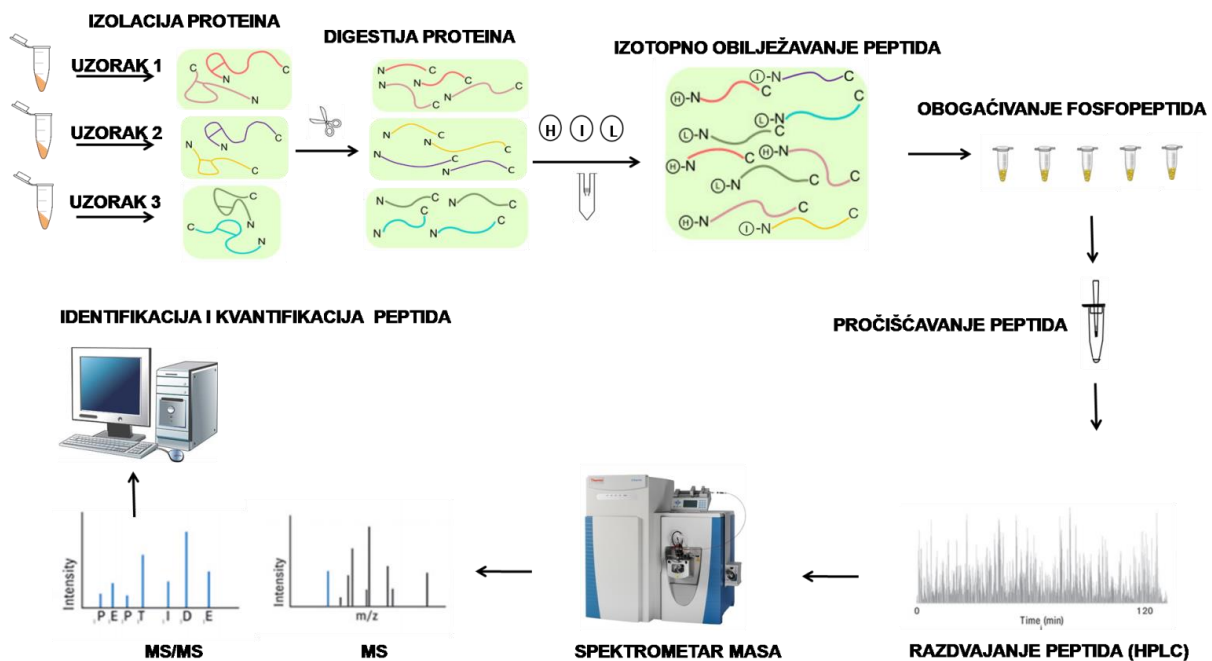
Statističke analize podataka dobivenih softverom MaxQuant provedene su u softveru Perseus (verzija 1.6.14.0.). Svi kontaminanti, obrnuti pogoci (engl. *reverse hits*) i proteini identificirani samo na mjestu modifikacije su uklonjeni. Za kvantitativne analize proteoma soja G7, podaci su filtrirani kako bi dobili listu proteina s barem jednim omjerom peptida izmjenjenim za oba replikata. Značajno promijenjeni proteini identificirani su t-testom s jednim uzorkom s p-vrijednošću od 0,05 i S0 parametrom od 0,1. Za analize fosfoproteoma soja G7, omjeri mjesta fosforilacije su normalizirani na njihove odgovarajuće omjere proteina, transformirani na  $\log_2$  i ucrtani u odnosu na odgovarajuće intenzitete  $\log_{10}$  transformiranih mjesta fosforilacije<sup>111</sup>. Za određivanje značajno promijenjenih mjesta fosforilacije korišten je proizvoljni prag od 1,5 na  $\log_2$  skali (trostruka promjena). Značajno regulirani proteini su dodijeljeni razvojnim fazama ukoliko je u njima zabilježena trostruka promjena njihove razine fosforilacije (ukoliko je mjesto fosforilacije kvantificirano u sve tri faze). Značajno regulirani proteini soja 23383, određeni su pomoću analize "significance B" s p-vrijednošću 0,05, a značajno regulirana mjesta fosforilacije primjenom proizvoljnog praga od 1 na  $\log_2$  skali (dvostruka promjena).

Proteini sa sličnim vremenskim profilima grupirani su korištenjem hijerarhijske analize grupiranja u programu Perseus. Za proteine identificirane u soju G7 ova analiza je provedena na značajno reguliranim proteinima dobivenim t-testom (p-vrijednost < 0,05). Proteini su normalizirani pomoću Z-vrijednosti (engl. *Z-score*) i grupirani na temelju izračuna Euklidske udaljenosti.

### 3.3.18. Odabir metode za analizu (fosfo)proteoma bakterije *S. rimosus*

Za globalnu analizu (fosfo)proteoma u ovom radu korišten je kvantitativni pristup koji se temelji na dimetilnom obilježavanju peptida stabilnim izotopima u kombinaciji s obogaćivanjem fosfopeptida i spektrometrijom masa visoke razlučivosti, opisan na Slici 12. Prvo su proteini izolirani iz bakterije u odabranim fazama rasta i cijepani tripsinom i endoproteinazom Lys-C koji cijepaju proteine nakon lizinskih ostataka (i argininskih u slučaju tripsina)<sup>112</sup>. Nastali peptidi su na N-terminalnim krajevima i lizinskim ostacima obilježeni izotopomernim dimetilnim "oznakama" na koloni što rezultira stvaranjem peptida s razlikom u masi od 4 Da: "laki", "srednje teški" ili "teški"<sup>107</sup>. Nakon obilježavanja, peptidi su pomiješani u jednakim količinama i podvrgnuti LC-MS/MS mjerenju kako bi se dobila informacija o

relativnim količinama proteina. Prije miješanja peptida, ugradnja "oznaka" je provjerena odvojenim LC-MS/MS mjerenjima pojedinačnih obilježenih uzoraka. Također je napravljena provjera miješanja peptida i korekcija ukoliko je bilo potrebno. Za analizu fosfoproteoma, nastali peptidi su prvo obogaćeni zncima titanovog dioksida, koji selektivno vežu negativno nabijene fosfopeptide, a zatim analizirani na LC-MS/MS kao zasebne frakcije (vidjeti 3.3.15.). Na kraju, dobiveni neobrađeni MS podaci obrađeni su pomoću softvera MaxQuant, a podaci su analizirani programima Perseus i Excel.



**Slika 12.** Tijek rada korišten u analizi (fosfo)proteoma bakterije *S. rimosus* temeljen na dimetilnom obilježavanju stabilnim izotopima. Proteini izolirani iz bakterije u odabranim fazama rasta su pocijepani na peptide i obilježeni "lakim", "srednje teškim" i "teškim" izotopima kako bi se mogla napraviti njihova kvantitativna usporedba. Peptidi su pomiješani u jednakim količinama i podvrgnuti LC-MS/MS mjerenju za analizu proteoma, dok su fosfopeptidi prvo obogaćeni zncima titanijevog dioksida ( $\text{TiO}_2$ ) tijekom 8-10 uzastopnih krugova, a frakcije su analizirane pomoću LC-MS/MS (Q Exactive HF maseni spektrometar). Nakon toga, dobiveni MS podaci obrađeni su pomoću softvera MaxQuant, a analiza podataka provedena je korištenjem različitih bioinformatičkih alata.

### 3.3.19. Funkcionalna anotacija i analiza funkcionalnog obogaćivanja

Proteini su funkcionalno anotirani dodjeljivanjem ortologa proteinskim sekvencama u softveru eggNOG (engl. *evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups*)<sup>113</sup>, koristeći sljedeće izvore: biološki procesi (GOBP), molekularne funkcije (GOMF) i stanični

odjeljci (GOCC) ontologije gena (engl. *gene ontology*, GO), Kyoto enciklopedija gena i genoma (KEGG), porodice proteina (PFAM) i enzimska komisija (EC). Prije izvođenja statističkih analiza, ove anotacije su dodane u Perseus. Proteini su prema eggNOG-u podijeljeni u četiri glavne funkcionalne kategorije i 20 podkategorija. Kako bi se dobio uvid u globalne trendove na temelju bioloških uloga proteina, fosforilirani proteini su dodatno su grupirani u šest proizvoljnih funkcionalnih kategorija jer je broj fosfoproteina u 20 potkategorija definiranih od strane eggNOG bio relativno mali, a broj kategorija je bio prevelik.

Nakon hijerarhijskog grupiranja proteina, svaki klaster je testiran na obogaćene pojmove na temelju spomenutih anotacijskih pojmova (engl. *annotation terms*) koristeći Fischerov egzaktni test. Pojmovi s prilagođenim p-vrijednostima ispod 0,05 u bilo kojem od klastera i s faktorom obogaćivanja iznad 1 smatrani su značajnim.

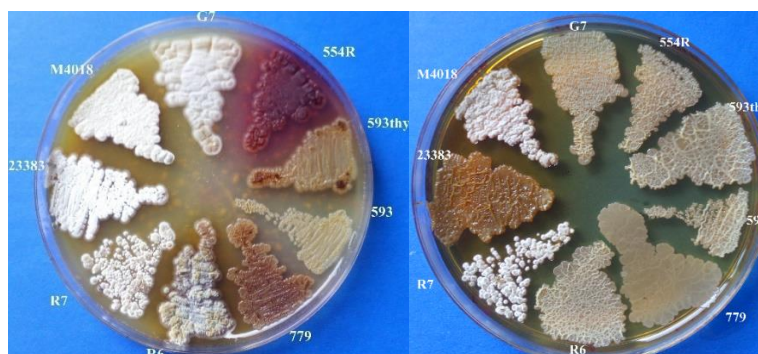
## 4. REZULTATI

### 4.1. Morfološke specifičnosti i sposobnost sinteze OTC-a sojeva bakterije *S. rimosus* dostupnih u laboratorijskoj kolekciji

Prvi cilj ove doktorske disertacije bio je ispitati morfološke specifičnosti dostupnih sojeva bakterije *S. rimosus* iz laboratorijske kolekcije, njihov rast i potencijal za proizvodnju OTC-a te profile fosforilacije kako bi se odabrali kandidati za identifikaciju proteoma i fosfoproteoma.

#### 4.1.1. Rast bakterija na krutom mediju i morfološke specifičnosti

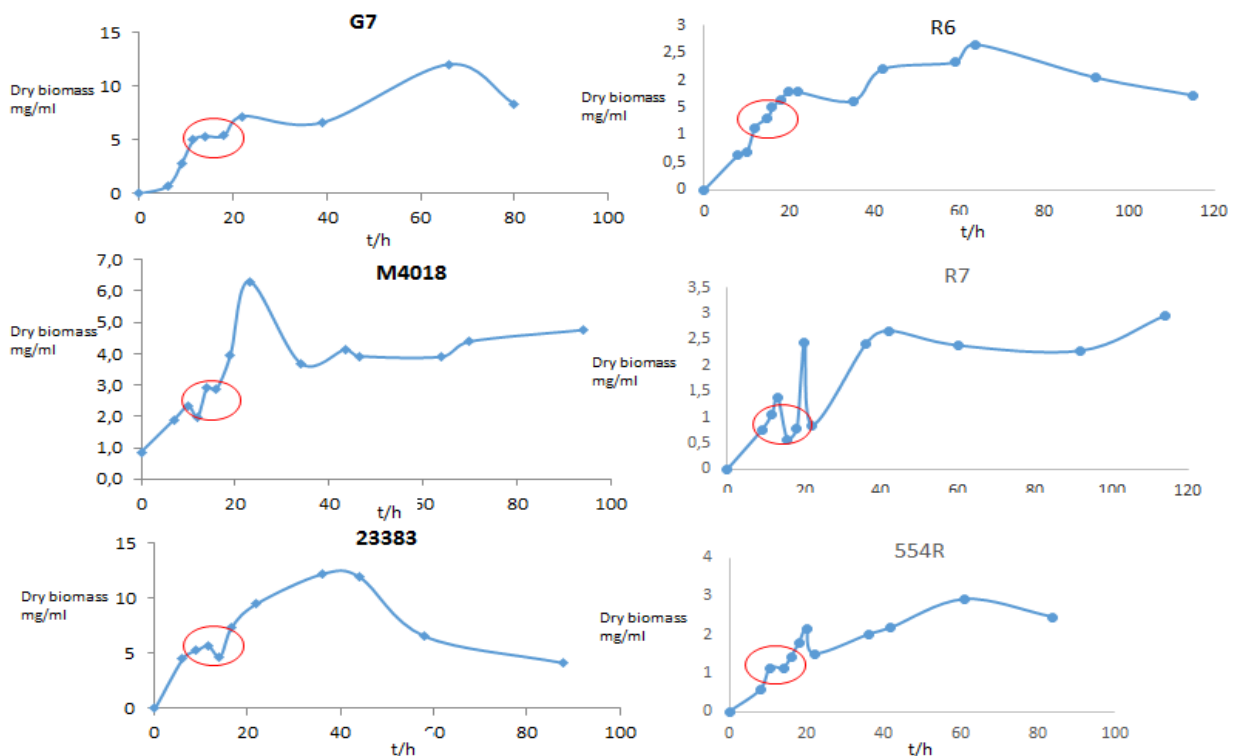
Bakterija *S. rimosus* ATCC 10970, poznata kao G7 ili R7, je divlji tip bakterije, odnosno ishodišni soj mnogih industrijskih sojeva koji se danas koriste za proizvodnju OTC-a, ali i mutiranih sojeva koji su se koristili za znanstvena istraživanja tijekom više desetljeća. Sve dostupne bakterije su uzgojene u tekućoj kulturi, nakon čega su nacijepljene na krute podloge kako bi se vidjele razlike u njihovim fenotipovima. Slika 13 prikazuje morfološke karakteristike bakterija na podlogama TSA (engl. *tryptic soy agar*) i MSA (engl. *soya mannitol agar*), prilagođenoj za sporulaciju bakterija. Kao što je vidljivo na slici, većina ispitanih sojeva sporulirala je na podlozi MSA (5/9) i pokazuju karakterističan sivo-bijeli fenotip, dok soj 554RED proizvodi prilikom sporulacije izrazito crveni pigment. Na podlozi TSA može se uočiti da samo dva soja sporuliraju, dok soj 23383 u odnosu na divlji tip i ostale sojeve proizvodi izrazito smeđi pigment. Kao što se vidi, površina kolonija kod većine sojeva je naborana i bez zračnog micelija.



**Slika 13.** Sojevi bakterije *S. rimosus* na različitim hranjivim podlogama. (A) Sojevi bakterije *S. rimosus* na podlozi MSA. (B) Sojevi bakterije *S. rimosus* na podlozi TSA.

#### 4.1.2 Rast bakterija u tekućem mediju

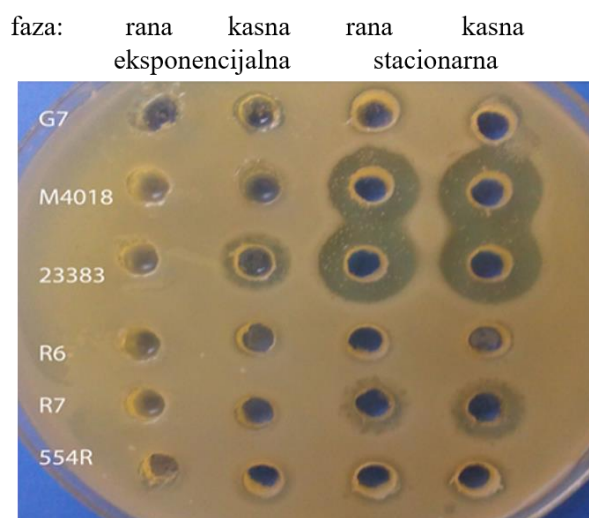
Rast bakterija je u tekućem mediju praćen mjerenjem suhe biomase do 120h nakon inokulacije tijekom koje je tekuća kultura ušla u kasnu stacionarnu fazu rasta. U ovim je eksperimentima korišten medij koji je prilagođen u industrijskom istraživačkom centru za optimizaciju proizvodnje OTC-a. Kao što je prikazano, svi ispitivani sojevi su pokazali karakterističan zastoje u rastu tijekom rane ekspanzionalne faze (između 15 i 20 h) (Slika 14). Nakon ovog kratkotrajnog zastoja, bakterije su nastavile rasti ekspanzionalno do otprilike 40h, odnosno 60h u nekim slučajevima. Isto tako se uočava da je dinamika ekspanzionalnog rasta različita u različitim sojevima, kao i to da se krivulja stacionarne faze razlikuje. Ono što se može također uočiti iz prikazanih krivulja rasta je visoki prinos biomase u nekim sojevima (otprilike 10 mg/ml suhe biomase) tijekom ekspanzionalne faze, dok je u nekim drugim sojevima maksimum prinosa biomase dosegnut kod ~3 mg/ml (Slika 14).



**Slika 14.** Krivulje rasta različitih sojeva bakterije *S. rimosus* u tekućem mediju. Bakterije su uzgajane u tekućem mediju do 120h. Crveni krugovi označavaju zastoje u rastu tijekom rane ekspanzionalne faze.

#### 4.1.3 Sinteza OTC-a

Sljedeći cilj je bio odrediti prinos OTC-a u tekućem mediju ispitivanih sojeva tijekom produljenog rasta bakterija. U odabranim točkama rasta, tijekom uzimanja uzoraka za mjerenje suhe biomase također su uzeti uzorci za određivanje koncentracije antibiotika. Također je napravljen antibiogram metodom bunarića na prikupljenim uzorcima supernatanta koristeći bakteriju *B. subtilis* (Slika 15). Kao što se vidi u prikazanim rezultatima, sojevi G7 i R6, kao i soj 554RED su pokazali jako slabu zonu inhibicije, čak i kasnoj fazi rasta kada dolazi do akumulacije antibiotika. Nešto veću zonu inhibicije pokazuje soj R7, dok su sojevi 23383 i M4018 pokazali izrazito velike zone inhibicije, što je sugeriralo da proizvode najviše OTC-a.



**Slika 15.** Antibiogram iz različitih sojeva bakterije *S. rimosus*. Uzorci kultura različitih sojeva bakterije *S. rimosus* su uzeti iz različitih faza rasta te je njihov potencijal za proizvodnju OTC-a ispitan na LB ploči s nacijepljenom bakterijom *B. subtilis*.

Nakon rezultata dobivenih na antibiogramu, proizvodnja OTC-a u različitim sojevima *S. rimosus* tijekom rasta je i kvantitativno određena pomoću HPLC-a. Ovom metodom su određene koncentracije OTC-a u uzorkovanom tekućem mediju te je određen potencijal sinteze antibiotika između odabranih sojeva (Tablica 12). Soj 23383 je izrazito najbolji proizvođač OTC-a u odnosu na druge odabrane sojeve i proizvodi ~35x više OTC-a u odnosu na divlji soj G7, dok je sljedeći po redu soj M4018 koji proizvodi 28x više antibiotika. Ovi rezultati jako dobro koreliraju s rezultatima antibiograma prikazanim na Slici 15.



**Tablica 12.** Koncentracije OTC-a proizvedenog u različitim sojevima bakterije *S. rimosus* tijekom odabranih faza rasta.

soj	554RED	R6	R7	23383	M4018	G7	faza rasta
OTC ( $\mu\text{g/mL}$ )	1,318236	1,127006	2,00951	4,319478	3,57975	1,332765	zastoj tijekom eksponencijalnog rasta (SI)
	2,164314	1,266747	14,80495	135,0177	45,24686	3,390497	prijelaz u stacionarnu fazu (SII)
	3,880218	1,154291	80,23166	236,7773	194,1736	7,06448	kasna stacionarna faza (SIII)

#### 4.1.4 Detekcija dinamike fosforilacije pomoću metode Western blot

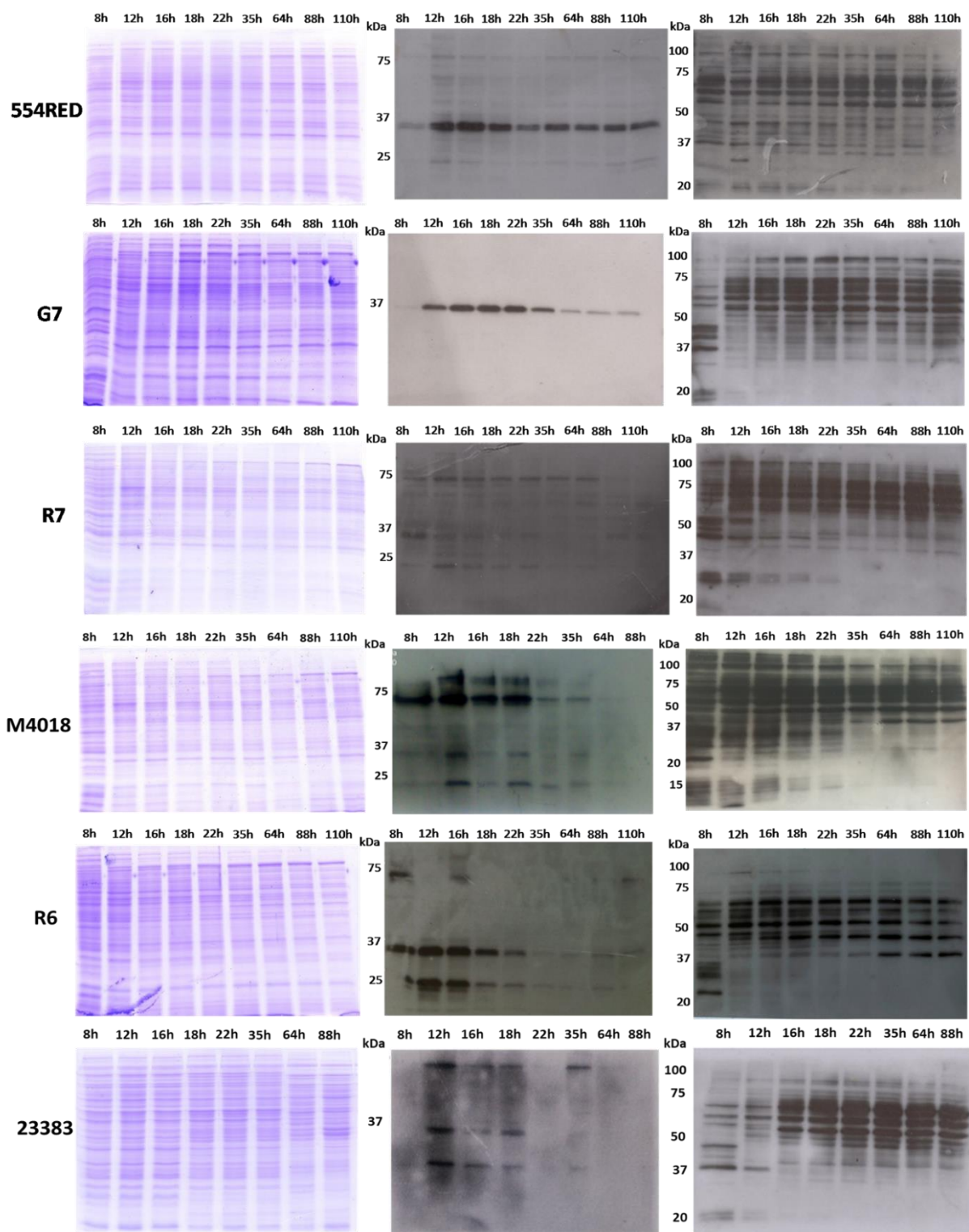
Dinamika fosforilacije proteina određena je metodom Western blot na staničnim lizatima uzoraka iz odabranih faza rasta. Kako bi rezultati ove metode bili usporedivi, prije izvođenja same metode, izmjerene su koncentracije ukupnih proteina u lizatima stanica i zatim su jednake koncentracije proteina (10  $\mu\text{g}$ ) nanese u jažice SDS-gelova. Vizualnom analizom obojanih proteinskih gelova je u svakom eksperimentu potvrđeno da su podjednake koncentracije proteina nanese u jažice SDS-gelova (lijevi stupac na Slici 16).

Za ispitivanje fosforilacije proteina korištena su dva tipa antitijela: (i) antitijelo ab15556 koje specifično prepoznaje aminokiselinske ostatke fosforilirane na S/T/Y, a nespecifično je za nefosforilirane proteine; i (ii) antitijelo 4G10 koje specifično prepoznaje samo aminokiselinske ostatke fosforilirane na Y.

Vizualna inspekcija obojanih gelova pokazuje razlike u proteinskim profilima bakterijskih lizata iz različitih faza rasta (Slika 16 – lijevi stupac). Neke proteinske vrpce su intenzivnije u ranim fazama rasta, dok su neke intenzivnije u kasnijim fazama rasta, što se uočava kod svih sojeva. Drugo, što se tiče antitijela, s obzirom da 4G10 prepoznaje samo fosforilaciju tirozinskih aminokiselinskih ostataka, očekivano se uočava manji broj signala (Slika 16 – srednji stupac). Uz navedeno, uočljivije su promjene ovog tipa fosforilacije prema kasnoj stacionarnoj fazi, gdje se vidi smanjenje intenziteta signala.

Suprotno rezultatima dobivenim s antitijelom 4G10, koristeći antitijelo koje specifično prepoznaje aminokiselinske ostatke fosforilirane na S/T/Y (Slika 16 – desni stupac), dobiven je puno veći broj signala. Dinamika fosforilacije se u svim sojevima bitno razlikuje u najranijim

fazama rasta (8h) u odnosu na 12h pa nadalje, što korelira s vremenom prije početka proizvodnje OTC-a i tijekom proizvodnje OTC-a. Fosforilacija nekih proteinskih vrpci se bitno povećava prema kasnijim fazama rasta, dok se fosforilacija manjeg broja proteinskih vrpci smanjuje. Rezultati ove analize ne daju odgovor na pitanje radi li se o istim proteinima koji se ili pojačano ili smanjeno fosforiliraju u nekim specifičnim fazama bakterijskog rasta.

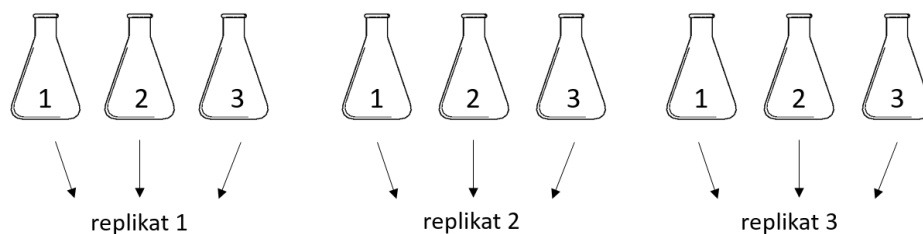


**Slika 16.** Profili fosforilacije proteina kod sojeva bakterije *S. rimosus* koji se razlikuju u proizvodnji OTC-a. U lijevom stupcu su prikazani SDS-gelovi s ujednačenim koncentracijama proteina izoliranih iz različitih faza za WB, u srednjem stupcu su profili fosforilacije različitih sojeva u različitim fazama na Y aminokiselinskim ostacima, a u desnom stupcu na STY aminokiselinskim ostacima.

#### 4.1.5. Odabir sojeva i točaka prikupljanja biomase za identifikaciju (fosfo)proteoma

Na temelju morfoloških analiza sojeva, kao i njihovog potencijala za sintezu OTC-a, odabrana su dva soja za identifikaciju proteoma i fosfoproteoma: divlji soj G7 koji proizvodi jako niske koncentracije OTC-a kao referentni soj i soj 23383, koji proizvodi visoke koncentracije OTC-a (Tablica 12).

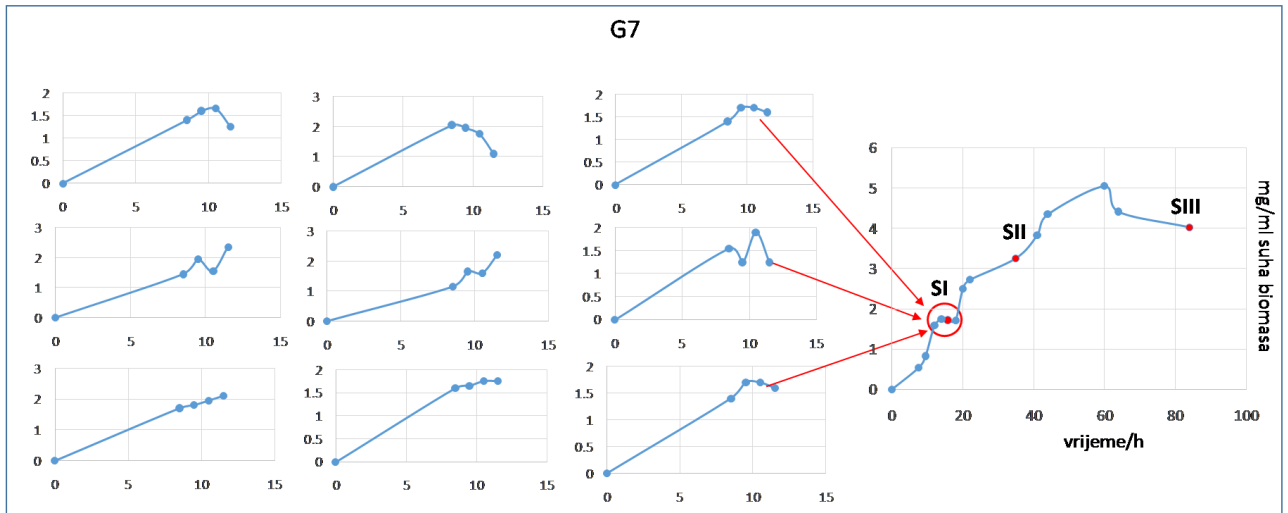
Kao što je prikazano na Slici 14, svi sojevi su u tekućoj kulturi pokazali zaustavljanje rasta tijekom rane eksponencijalne faze rasta (~16h-20h). Ova faza korelira s početkom proizvodnje OTC-a. Budući da je cilj bio dobiti bolji uvid u događaje fosforilacije koji bi mogli biti ključni za proizvodnju OTC-a, na temelju ovog opažanja odabrana je prva točka rasta za prikupljanje bakterijske biomase (SI). Kao druga točka (SII) odabrana je faza prijelaza iz eksponencijalne u stacionarnu fazu (~35-40h), a kasna stacionarna faza (SIII) je izabrana kao treća točka za prikupljanje biomase, budući da tijekom njih bakterije reagiraju na iscrpljivanje hranjivih tvari i nakupljaju antibiotike (~85-90h). Zbog složenog životnog ciklusa i micelijskog rasta, biomasa je prikupljena u više bioloških replikata, kako bi se dobili što pouzdaniji rezultati. Kako se ne bi značajno promijenili fermentacijski uvjeti, za svaki replikat korištene su tri tikve (shematski prikazano na Slici 17). Naime, ovaj pristup je primijenjen jer su preliminarna istraživanja pokazala koju je minimalnu količinu biomase potrebnu uzorkovati u svakoj točki po replikatu (500 mg). Višekratnim uzorkovanjem iz samo jedne tikve volumen tekuće kulture bi se značajno smanjivao tijekom rasta bakterija, a time bi se značajno promijenili i uvjeti rasta npr. aeracija, što bi u konačnici utjecalo i na proteom i fosfoproteom. Zato su se, kako je shematski prikazano na Slici 17, iz tri tikve prikupljali jednaki volumeni bakterijske kulture i spajali tvoreći jedan replikat.



**Slika 17.** Shema prikupljanja biomase za identifikaciju proteoma i fosfoproteoma.

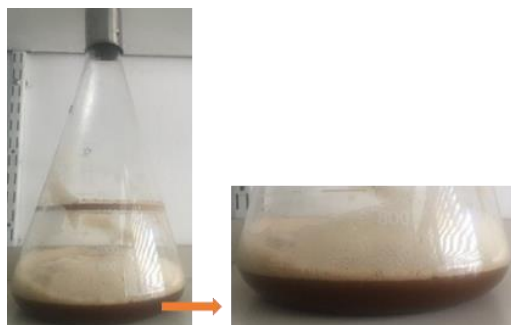
Slike 18 i 20 prikazuju krivulje rasta sojeva G7 i 23383, odabranih za identifikaciju (fosfo)proteoma s označenim fazama odabranim za prikupljanje biomase. Tijekom zastoja u

rastu, uočene su najveće fluktuacije biomase pa je u toj fazi rasta napravljeno uzorkovanje u kraćim vremenskim razmacima, kako bi se s većom pouzdanošću prikupila biomasa u trenutku kad bakterija stagnira u svom rastu.



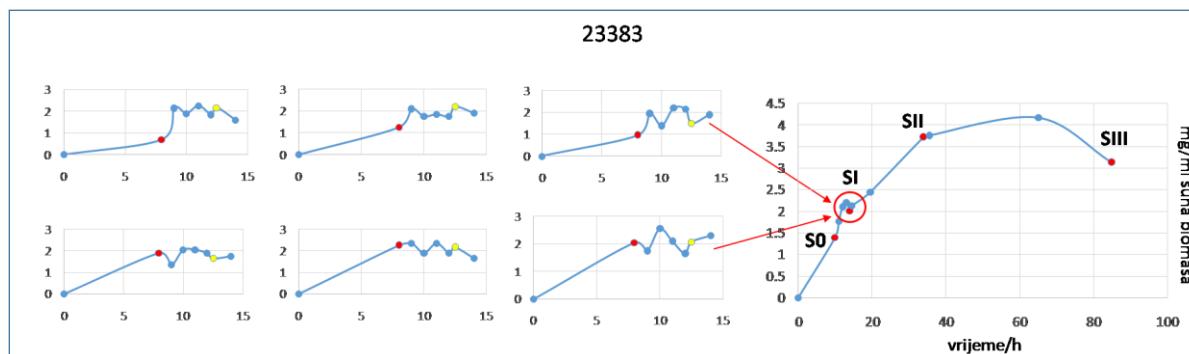
**Slika 18.** Krivulja rasta soja G7 bakterije *S. rimosus*. Faze za prikupljanje biomase za identifikaciju (fosfo)proteoma su naznačene (SI, SII i SIII) na krivulji rasta (desna strana slike). Crveni krug označava kratkotrajnu fazu zaustavljanja tijekom rane eksponencijalne faze, koja je detaljnije ispitana (lijeva strana slike).

Ono što je uočeno kod uzgoja soja 23383 je pojačano nakupljanje smeđeg pigmenta koje je koreliralo s proizvodnjom antibiotika (Slika 19), za razliku od divljeg soja koji je bio žućkasto-smeđe boje. Preliminarni eksperimenti su pokazali da nakupljeni pigment uzrokuje velike probleme na HPLC kolonama koje su u sprezi sa spektrometrom mase, stoga je kod pripreme uzoraka iz ovog soja uveden dodatan korak za pročišćavanje preko grafitne kolone kako bi se uklonio nakupljeni pigment.



**Slika 19.** Nakupljanje smeđeg pigmenta tijekom uzgoja soja 23383 u tekućoj kulturi.

S obzirom da je ovim načinom pripreme uzoraka za MS, koji uključuje dodatan korak pročišćavanja peptida, dolazilo do gubitaka određenih peptida, za soj 23383 je uvedena još jedna točka za prikupljanje biomase (S0). Ovo je faza jako ranog eksponencijalnog rasta u kojoj su mlade hife micelija uglavnom raspršene i doprinose rastu, ali još uvijek ne formiraju nakupine (Slika 20).



**Slika 20.** Krivulja rasta soja 23383 bakterije *S. rimosus*. Faze za prikupljanje biomase za identifikaciju (fosfo)proteoma su naznačene (S0, SI, SII i SIII) na krivulji rasta (desna strana slike). Crveni krug označava kratkotrajnu fazu zaustavljanja tijekom rane eksponencijalne faze, koja je detaljnije ispitana (lijeva strana slike).

## 4.2. Kvalitativna analiza proteoma i fosfoproteoma bakterije *S. rimosus*, sojeva G7 i 23383

Proteomi i fosfoproteomi sojeva G7 i 23383 bakterije *S. rimosus* analizirani su u specifičnim fazama rasta bakterije prema metodi detaljno opisanoj u poglavlju Materijali i metode. Tijek rada pripreme ovih uzoraka za analizu spektrometrijom masa opisan je u podpoglavlju 3.3.18. (Slika 12).

### 4.2.1 Kvalitativna analiza proteoma soja G7

U proteomu soja G7 iz tri specifične faze rasta bakterije u dva biološka replikata sveukupno je identificirano 200 982 MS/MS spektara koji odgovaraju 33 023 neredundantnih peptida i 3725 proteinskih grupa, ukupno 45.6% *in silico* predviđenog proteoma bakterije *S. rimosus*. Od ukupno 3725 proteina, 2441 proteina su identificirana u oba replikata, 1279 samo u prvom replikatu i 5 samo u drugom replikatu. Kako bi se odredila konzistentnost između dva biološka replikata, izračunati su Pearsonovi koeficijenti korelacije za svaki izmjereni omjer proteina između dvije faze rasta (SII/SI, SIII/SI i SIII/SII). Omjer proteina dobiven za SIII/SII i SIII/SI

(0,82 odnosno 0,84) pokazao je dobru konzistentnost između replikata, dok je za omjer proteina SII/SI konzistentnost bila nešto niža (0,64), ali još uvijek dostatna za statističku obradu podataka (Slika P 1).

#### 4.2.2 Kvalitativna analiza fosfoproteoma soja G7

U analizi fosfoproteoma, identificirano je 230 fosfoproteina koji sadrže 417 fosforiliranih mjesta. Među njima, 120 proteina je bilo fosforilirano na jednom mjestu, dok je 110 proteina fosforilirano na dva ili više mjesta. Uspješno je lokalizirano 315 mjesta fosforilacije na S, T ili Y aminokiselinskom ostatku s visokom pouzdanošću (vjerojatnost lokalizacije  $\geq 0,75$ ). Za 66 mjesta fosforilacije vjerojatnost lokalizacije je bila u rasponu od 0,5 do 0,75, dok je za 36 mjesta fosforilacije vjerojatnost lokalizacije je bila niža od 0,5 stoga se ta mjesta nisu mogla pouzdano lokalizirati na određeni aminokiselinski ostatak u fosfopeptidu. Na razini fosfoproteoma koeficijenti korelacije bili su 0,55 za omjere fosfopeptida SII/SI, 0,75 za SIII/SI i 0,74 za SIII/SII (Slika P 2). Što se tiče raspodjele fosforilacije na serinu, treoninu i tirozinu, fosforilacija treonina je bila dominantna (53,48 %), nakon čega je slijedila fosforilacija serina (41,25 %), dok je fosforilacija na tirozinu bila najniža (5,28 %).

#### 4.2.3 Kvalitativna analiza proteoma soja 23383

Proteom soja 23383 analiziran je u više faza rasta i bioloških replikata što je detaljno navedeno u poglavlju Materijali i metode (Tablica 11). U eksperimentu 1, u kojem su analizirane tri faze rasta (SI, SII, SIII) u 3 biološka replikata, sveukupno je identificirano 66 980 MS/MS spektra koji odgovaraju 17 597 neredundantnih peptida i 2141 proteinskih skupina (26,2% predviđenog proteoma bakterije *S. rimosus*). U eksperimentu 2, u kojem je prva faza rasta (SI) uspoređivana s fazom prije (S0) ili poslije nje (SII), sveukupno je identificirano 115 614 MS/MS spektara koji odgovaraju 11 699 neredundantnih peptida i 2309 proteinskih skupina (28,3% predviđenog proteoma *S. rimosus*). U eksperimentu 3, u kojem je kvalitativno ispitivana samo jedna faza rasta (SI ili SII), sveukupno je identificirano 88 804 MS/MS spektra koji odgovaraju 19 521 neredundantnih peptida i 2670 proteinskih skupina (32,7% predviđenog proteoma bakterije *S. rimosus*). Sveukupno, uzevši u obzir sva mjerenja, u ovom soju je identificirano 2875 proteina što odgovara 35,2% predviđenog proteoma bakterije *S. rimosus*.

Kako bi se odredila konzistentnost između bioloških replikata, izračunati su koeficijenti korelacije za svaki omjer proteina u eksperimentu 1 (Slika P 3). Ukupno gledajući, replikat 1 i

replikati 2 su pokazali bolju konzistentnost u odnosu na replikat 1 i 3 te replikat 2 i 3. Omjer proteina dobiven za SII/SI i SIII/SI (0,67 odnosno 0,66) pokazao je osrednju konzistentnost između replikata 1 i 2, dok je za omjer proteina SIII/SII konzistentnost bila nešto lošija (0,41). Omjer proteina za SIII/SI pokazao je osrednju konzistentnost između sva tri replikata (0,6), dok je za ostale omjere ona bilo lošija (0,3-0,4). U eksperimentu 2A, u kojem je u istom mjerenju uspoređivana faza SI iz dva biološka replikata s fazom S0 u jednom biološkom replikatu, korelacije su bile znatno bolje (Slika P 4). Korelacije između omjera proteina za SI (rep. 1)/S0 i SI (rep. 2)/S0 su bile 0,8 u uzorcima pripremljenim bez grafita i 0,74 u uzorcima pripremljenim sa grafitom. Korelacije omjera proteina iz istih uzoraka, ali pripremljenih na drukčiji način (sa i bez grafita) su očekivano pokazale dobru konzistentnost 0,74 za SI (rep. 1)/S0 i 0,76 za SI (rep. 2)/S0.

#### 4.2.4 Kvalitativna analiza fosfoproteoma soja 23383

U analizi fosfoproteoma soja 23383, u svim eksperimentima identificirano je sveukupno 288 fosfoproteina koji sadrže 521 mjesta fosforilacije. Među njima, 128 proteina je bilo fosforilirano na jednom mjestu, dok je 160 proteina fosforilirano na dva ili više mjesta. Uspješno je lokalizirano 359 mjesta fosforilacije na specifičnom aminokiselinskom ostatku s visokom pouzdanosti (vjerojatnost lokalizacije  $\geq 0,75$ ). Ostalih 160 mjesta fosforilacije imalo je manju vjerojatnost lokalizacije, u rasponu od 0,5 do 0,75, i stoga ih se nije moglo pouzdano lokalizirati na određeni aminokiselinski ostatak u fosfopeptidu. U Tablici 13 su prikazani detaljni podaci za svaki eksperiment posebno. Na razini fosfoproteoma koeficijenti korelacije između različitih replikata su bili loši ili nije uopće bilo korelacije.

**Tablica 13.** Broj identificiranih fosforiliranih proteina i mjesta fosforilacije u soju 23383.

		<b>eksperiment 1</b> <b>(SI/S0)</b>	<b>eksperiment 2</b> <b>(SI/SII/SIII)</b>	<b>eksperiment 3</b> <b>(SI ili SII)</b>
<b>broj identificiranih mjesta fosforilacije/broj proteina</b>		117/202	136/234	133/222
<b>broj ukupnih mjesta fosforilacije na proteinu</b>	1x	69	76	77
	2x	40	35	36
	3x	36	15	12
	4x	57	8	6
	5x	0	1	1



	6x	0	1	0
	8x	0	0	2
<b>vjerojatnost lokalizacije</b>	0,75-1	121	152	164
	0,5-0,75	33	39	34
	< 0,5	48	43	24
<b>raspodjela fosforiliranih aminokiselinskih ostataka</b>	serin	40,17%	40,59%	42,79%
	treonin	52,56%	54,95%	54,05%
	tirozin	7,26%	4,45%	3,15%

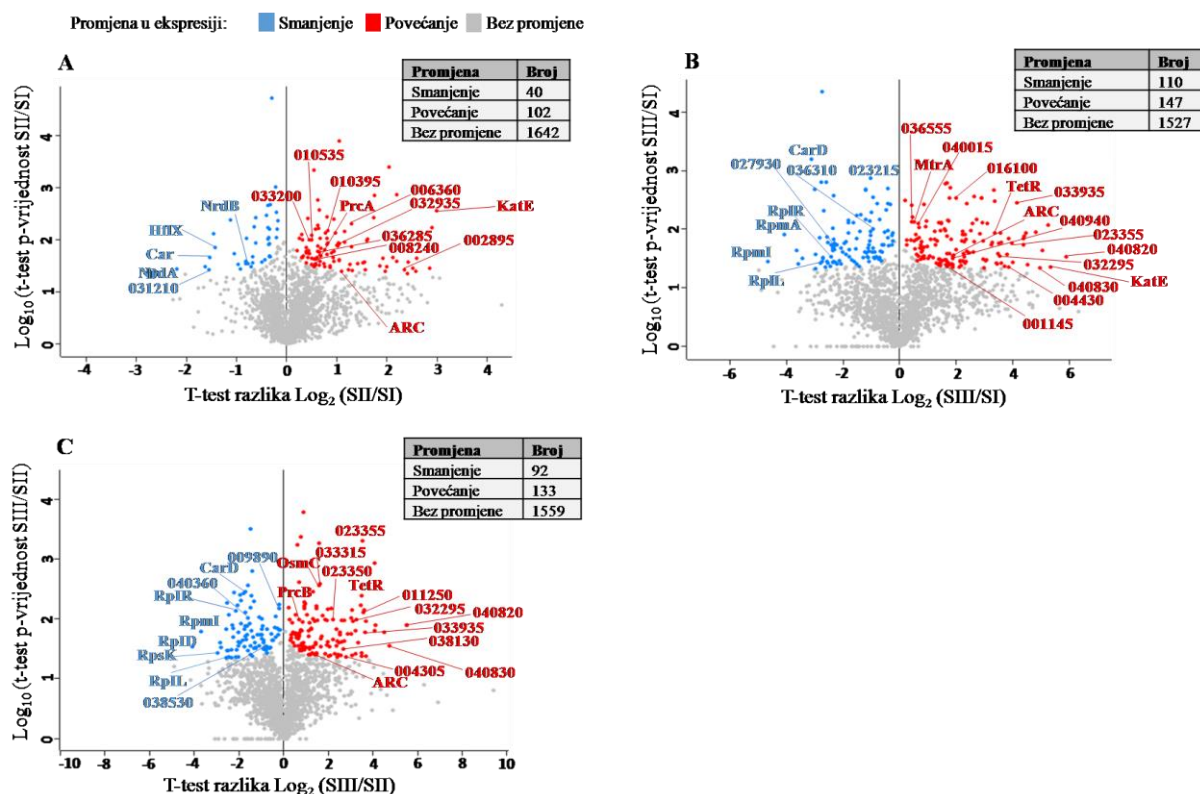
Raspodjela fosforilacije na serinu, treoninu i tirozinu bila je u skladu s raspodjelom u divljem soju, što odgovara prethodnim opažanjima u streptomycetima<sup>14</sup>. Fosforilacija treonina je bila dominantna u svim eksperimentima (prosječna vrijednost 53,85%), nakon čega je slijedila fosforilacija serina (prosječna vrijednost 41,18%). Fosforilacija na tirozinu bila je, kao i u divljem soju, nešto niža od očekivanog (prosječna vrijednost 4,95%).

#### **4.3. Kvantitativna analiza proteoma i fosfoproteoma bakterije *S. rimosus*, sojeva G7 i 23383 u različitim fazama rasta**

Sljedeći cilj ove disertacije bio je dobiti detaljan uvid u dinamiku sinteze i fosforilacije proteina kako bismo te promjene povezali s rastom bakterije i proizvodnjom antibiotika. U tu svrhu napravljena je kvantitativna analiza korištenjem dimetilnog obilježavanja stabilnim izotopima peptida dobivenih iz proteina u različitim fazama rasta, kao što je opisano u odjeljku 3.3.12. (detaljan pregled izvršenih eksperimenata prikazan je u Tablici 11).

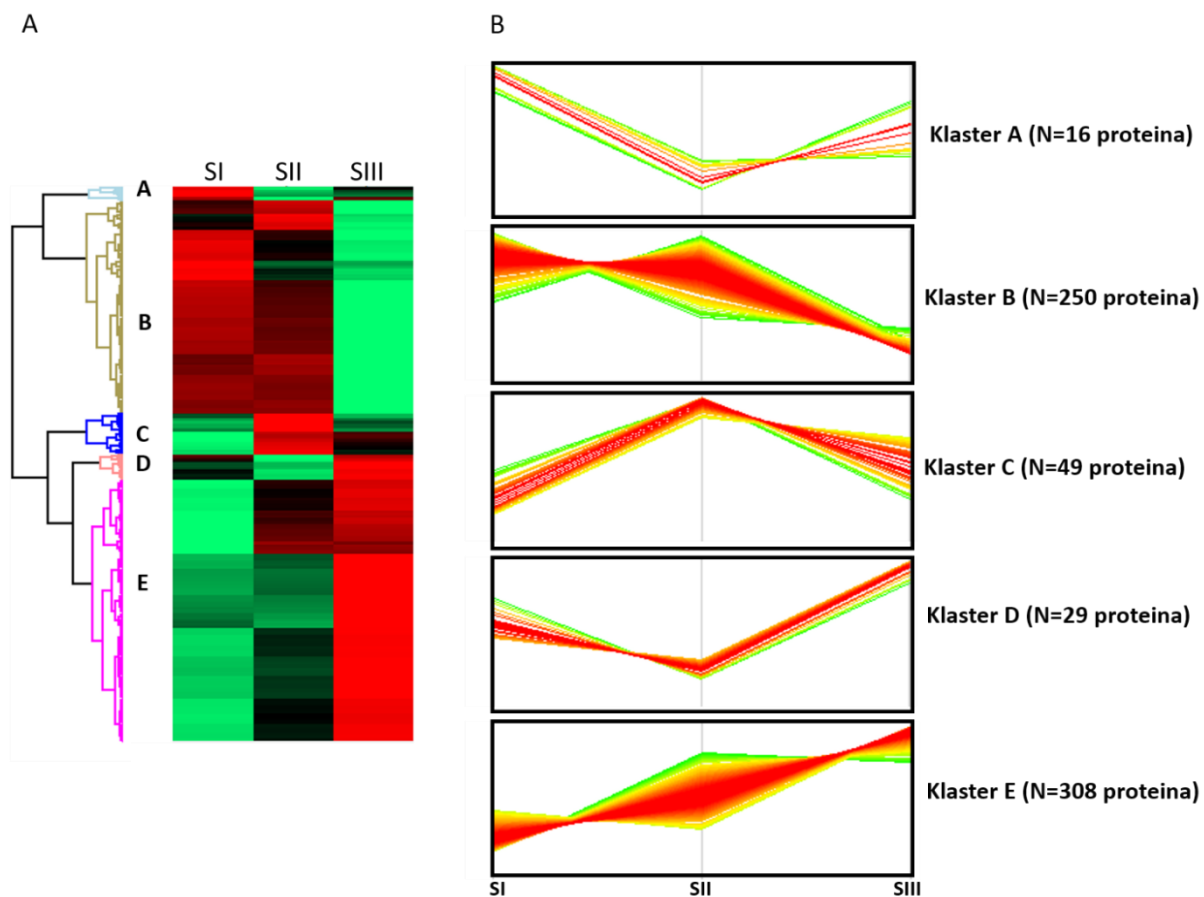
##### **4.3.1. Kvantitativna analiza proteoma soja G7**

Kao što je prikazano u prethodnom podpoglavlju, kvalitativnom analizom proteoma soja G7 bakterije *S. rimosus* identificiran je velik broj proteina (3725). Svi proteini koji su imali barem jedan izmjereni omjer proteina između dvije faze rasta u barem jednom od dva biološka replikata su smatrani kvantificiranim (3353/3725). Radi preciznije kvantitativne analize, podaci su filtrirani kako bi dobili listu proteina s bar jednim izmjerenim omjerom proteina u oba replikata (1784 proteina). Ovi proteini podvrgnuti su t-testu s graničnom p-vrijednošću od 0,05 i parametrom promjene  $S_0$  od 0,1. T-test-om je dobiveno 494 proteina sa značajnim promjenama u barem jednom omjeru proteina između dvije faze rasta. Distribucija proteina sa značajnim promjenama u njihovoj ekspresiji prikazana je za tri omjera proteina na Slici 21.



**Slika 21.** Raspodjela diferencijalno eksprimiranih proteina tijekom rasta *S. rimosus*. Vulkano plot pokazuje značajno promijenjene proteine koji su prošli t-test pri p-vrijednosti od 0,05 i  $S_0$  od 0,1. Y-os ( $-\log_{10}$  p-vrijednost) predstavlja razinu značaja svakog proteina, dok x-os ( $\log_2$  promjena) predstavlja srednju vrijednost omjera proteina između dvije različite faze rasta dobivene iz dva replikata (A – SII/SI; B – SIII/SII; C – SIII/SII). Proteini čija je ekspresija značajno povećana u danom omjeru prikazani su crvenim kružićima, a oni čija je značajno smanjena prikazani su plavim kružićima. Za ovaj rad najinteresantiji proteini prikazani crvenim i plavim kružićima su označeni imenima njihovih gena ili SRIM\_oznakama.

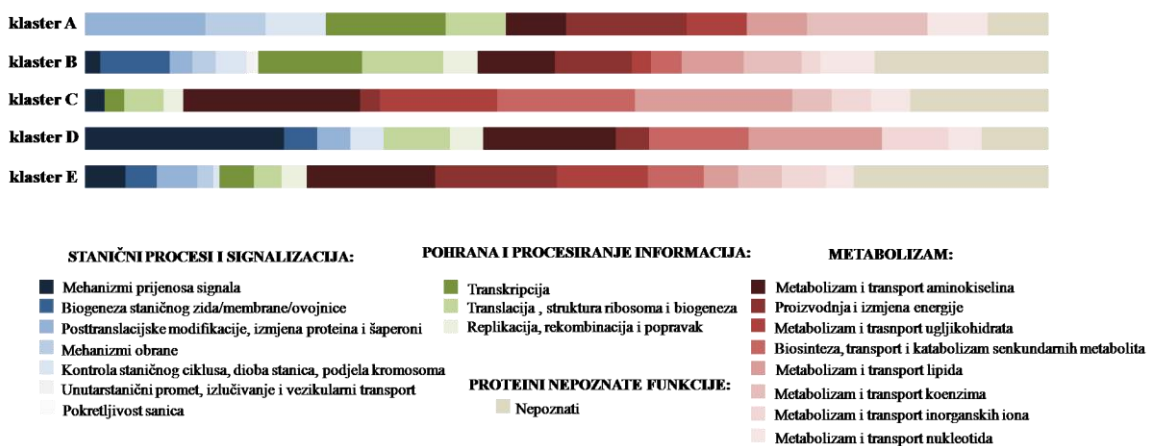
Zatim je napravljeno hijerarhijsko grupiranje proteina s p-vrijednošću  $< 0,05$  (ukupno 652 proteina) kako bi se identificirali proteini sa sličnim vremenskim profilima tijekom rasta soja G7. Grupiranje u klaster napravljeno je na temelju  $\log_2$  transformiranih omjera proteina normaliziranih pomoću tzv. Z-vrijednosti. Proteini su grupirani u toplinskoj karti (Slika 22A), a broj klastera je postavljen na pet (Slika 22B).



**Slika 22.** Toplinska karta i klasteri proteina sa sličnim vremenskim profilima. (A) Toplinska karta prikazuje promjenu ekspresije proteina tijekom tri faze rasta. Zelena boja označava smanjenje ekspresije, crvena boja označava povećanje ekspresije, a crna boja odgovara približno nuli. (B) Proteini sa značajnim promjenama u svojoj ekspresiji tijekom rasta *S. rimosus* (SI, SII i SIII) grupirani su u pet klastera na temelju njihovih  $\log_2$  transformiranih omjera proteina normaliziranih prema Z-vrijednosti s obzirom na sličnost u promjeni njihove ekspresije tijekom rasta bakterije.

U tablici P 1 sadržan je popis svih proteina unutar svakog klastera pojedinačno, podijeljenih po funkcionalnim kategorijama i podkategorijama. Kao što se može vidjeti na Slici 22B, većina proteina pokazala je profile klastera B i E (približno 85% proteina). Klaster B je karakteriziran smanjenjem ekspresije proteina prema kasnoj stacionarnoj fazi, dok je klaster E karakteriziran kontinuiranim povećanjem ekspresije proteina tijekom rasta bakterije. Osim klastera B, proteini koji pokazali značajno povećanje u ekspresiji tijekom faze zaustavljanja rasta (SI) grupirani su i u klaster A. Klaster A sadrži samo 16 značajno promijenjenih proteina, od čega je većina podjednako raspoređena u kategorijama "Posttranslacijske modifikacije, izmjena proteina, šaperoni", "Transkripcija", "Proizvodnja i pretvorba energije" i "Transport i metabolizam

koenzima" (12,5%) (Slika 23). Klaster B sadrži značajno veći broj diferencijalno reguliranih proteina (250), koji uglavnom pripadaju tri kategorije: "Nepoznati proteini" (18%), "Transkripcija" (10,8%) i "Translacija, struktura ribosoma i biogeneza" (8,5%). Klaster C se sastoji od 49 proteina čija je ekspresija značajno povećana u SII, uglavnom uključenih u "Transport i metabolizam aminokiselina" (18,4%), "Transport i metabolizam lipida" (16,3%), "Biosintezu transport i katabolizam sekundarnih metabolita" (14,3%) i kategorije "Proteini nepoznate funkcije" (14,3%). Za razliku od klastera A i B čiji su proteini pojačano eksprimirani u SI, proteini koji pripadaju klasteru D i E imaju povećanu ekspresiju tijekom kasne faze rasta (SIII). Klaster D se sastoji od 29 proteina uključenih u podkategorije "Mehanizmi prijenosa signala" (20,7%) u najvećem udjelu, nakon čega slijede "Transport i metabolizam aminokiselina" i "Transport i metabolizam lipida" (13,8%). Klaster E sadrži 308 proteina, koji uglavnom pripadaju kategoriji "Nepoznati proteini" (20,1%), nakon čega slijede "Transport i metabolizam aminokiselina" (13,3%) i "Proizvodnja i pretvorba energije" (12,7%).



**Slika 23.** Raspodjela proteina po funkcionalnim (pod)kategorijama prema programu eggNOG unutar klastera. Svaka linija predstavlja raspodjelu udjela (obojanih različitim nijansama iste boje) funkcionalnih podkategorija u svakom klasteru proteina posebno.

Kako bi se identificirale statistički najrelevantnije biološke klase proteina s različitom ekspresijom tijekom rasta soja G7, izvršena je analiza obogaćivanja svih pojmova funkcionalne anotacije dobivenih iz različitih izvora (vidi Materijali i metode) za svaki klaster zasebno (A-E) koristeći Fisherov egzaktni test s p-vrijednošću od 0,05 (i Benjamin Hoch prilagođenom vrijednošću FDR 0,2). Time je otkriveno 36 značajno reguliranih pojmova (engl. *enriched annotation terms*) u četiri klastera s faktorom obogaćivanja iznad 1 i p-vrijednošću manjom od 0,05 (Tablica P 2). Jedino u klasteru A nije pronađen nijedan "obogaćeni" pojam, što je i

očekivano s obzirom na mali broj pripadajućih proteina ovog klastera (16). Klaster B je značajno obogaćen proteinima potrebnim za vitalne stanične procese, kao što su RNA polimeraze, proteini uključeni u transkripciju, u biosintezi stanične stijenke/membrane i sl. (npr. NrdA and NrdB koji su uključeni u sintezu DNA, ribosomalni proteini RpmI, RpmIL and RpsK itd. – Slika 21).

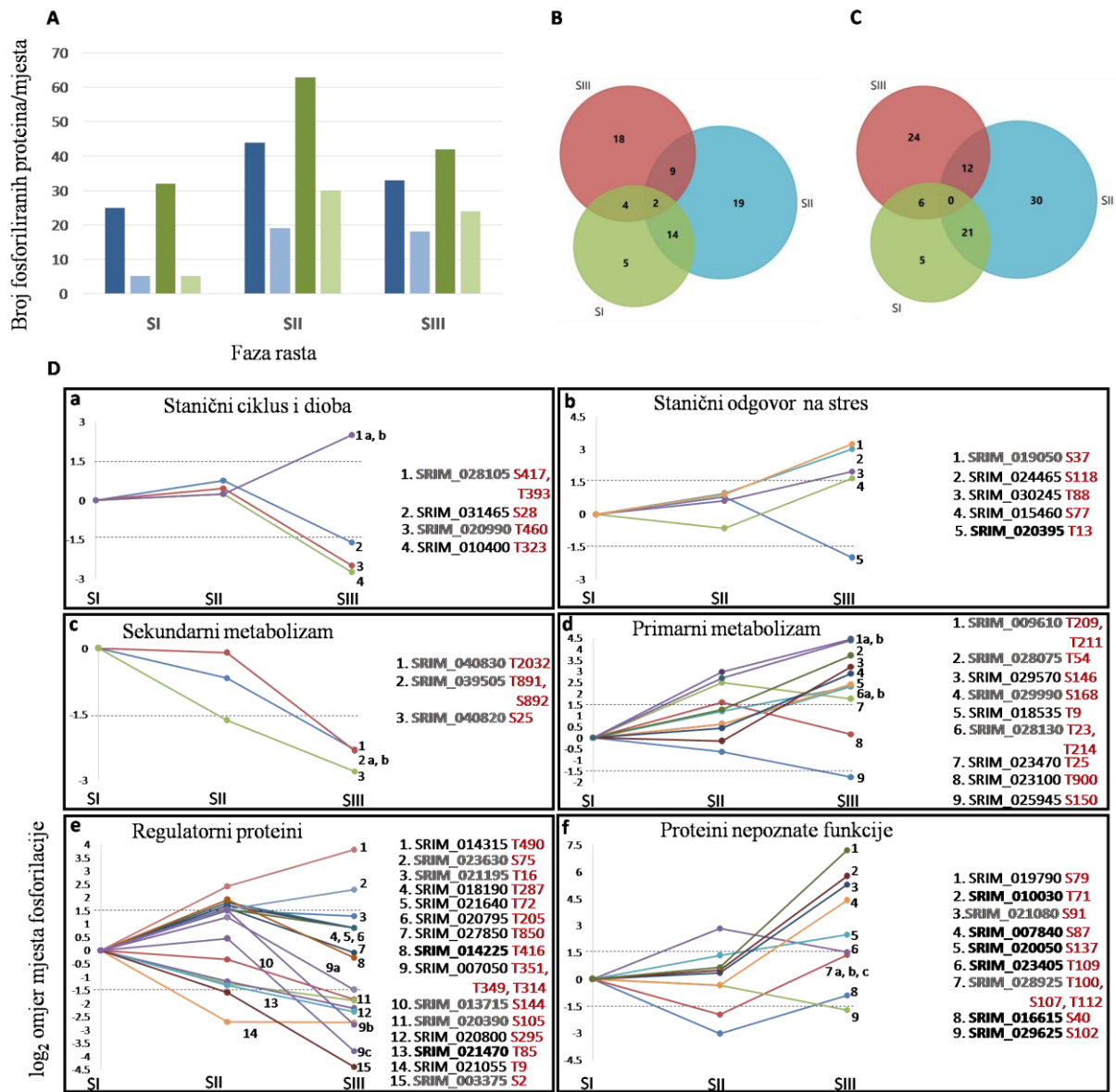
Proteini povezani sa sekundarnim metabolitima i lipidima značajno su zastupljeni u klasteru C, koji predstavlja proteine sa značajno povećanom ekspresijom tijekom SII faze. Klaster D, koji se sastoji od proteina sa diferencijalno povećanom ekspresijom u SIII, značajno je obogaćen proteinima koji sudjeluju u prijenosu signala i "dvokomponentnim sustavima". Većina ovih proteina sudjeluje u odgovoru na stres (npr. MtrA, OsmC, KatE - Slika 21). Konačno, klaster E je značajno obogaćen u proteinima nepoznate funkcije i proteinima koji sudjeluju u različitim procesima primarnog metabolizma (npr. proizvodnja i pretvorba energije, metabolizam aminokiselina i ugljikohidrata). Ovaj klaster je također obogaćen proteinima povezanim s proteasomom (npr. ARC, PrcA, PrcB), te proteinima koji sudjeluju u metabolizmu glutaciona.

#### 4.3.2. Kvantitativna analiza fosfoproteoma soja G7

U fosfoproteomu, od 417 mjesta fosforilacije identificiranih u ovom radu za divlji soj, 191 je imalo barem jedan izmjereni omjer fosfopeptida (npr. SII/SI i SIII/SI) u bar jednom replikatu. Kako bi se identificirali diferencijalno fosforilirani proteini, definiran je arbitrarni prag promjene od 3x (1,5 na skali  $\log_2$ ) za omjere fosfopeptida koji su prethodno normalizirani na omjere odgovarajućih proteina iz istih stadija rasta, kao što je korišteno u objavljenim studijama<sup>26</sup>. Ovim pristupom identificiran je 71 protein s ukupno 98 diferencijalno reguliranih mjesta fosforilacije. Među njima, 55 proteina imalo je samo jedno fosforilirano mjesto, dok je 16 proteina bilo višestruko fosforilirano. Osam od ovih 16 proteina pokazalo je pojačanu fosforilaciju svih mjesta u istoj fazi (fazama), dok je druga polovica pokazala fosforilaciju različitih mjesta fosforilacije u različitim fazama rasta.

Ovi fosfoproteini, grupirani u šest funkcionalnih kategorija kako je opisano u Materijalima i metodama, podijeljeni su između faza rasta u skladu s povećanjem razine njihove fosforilacije. Slika 24A pokazuje broj diferencijalno povećanih fosfoproteina/mjesta fosforilacije (jedinstvenih i ukupnih) u svakoj fazi, dok je broj fosfoproteina i mjesta fosforilacije koji su pokazali povećanje u više od jedne faze rasta prikazani na slikama 24B i C. Najveći broj fosfoproteina/mjesta fosforilacije diferencijalno je povećan u SII fazi, dok se većina zajedničkih

fosfoproteina/mjesta fosforilacije opaža u fazama SI i SII. Na slici 24D su prikazani vremenski profili proteina s povećanom razinom fosforilacije isključivo u jednoj fazi rasta.



**Slika 24.** Distribucija (A i B) i dinamika diferencijalno fosforiliranih proteina tijekom rasta soja G7 (C). (A) Broj ukupnih i jedinstvenih diferencijalno povećanih fosfoproteina/mjesta fosforilacije prema fazama rasta (tamnoplavo - svi proteini, svijetloplavo - jedinstveni proteini (za fazu), tamnozeleno - sva mjesta fosforilacije, svijetlozeleno - jedinstvena mjesta fosforilacije). (B) Venovi dijagrami predstavljaju fosfoproteine i (C) mjesta fosforilacije zajednička između različitih faza rasta. (D) Dinamika proteina s diferencijalno reguliranim mjestima fosforilacije tijekom faza rasta (fosfoproteini označeni podebljanim slovima prvi su put su detektirani u ovoj studiji; kod streptomiceta u sivoj boji ili kod prokariota u crnoj boji).

#### 4.3.2.1. Fosforilacija proteina u SI fazi

Tijekom faze zaustavljanja rasta (SI), uočljivo je kako 4/5 fosfoproteina (Slika 24D-e) pripadaju kategoriji "Regulatorni proteini": ST protein kinaza (SRIM\_020800), ST fosfataza (SRIM\_021470), transkripcijski regulator (SRIM\_021055) i faktor utišavanja ribosoma – RsfS (SRIM\_013715), dok jedan protein (SRIM\_040820) pripada kategoriji „Sekundarni metabolizam“ (član porodice SDR oksidoreduktaza) što reflektira najvjerojatnije uključivanje regulatornih mehanizama o kojima će se više diskutirati u poglavlju Diskusija.

#### 4.3.2.2. Fosforilacija proteina u SII fazi

Većina fosfoproteina s povećanom razinom fosforilacije u SII fazi također pripada kategoriji "Regulatorni proteini" i uključuju tri ST kinaze (SRIM\_018190, SRIM\_020795 i SRIM\_025105), jednu ST fosfatazu (SRIM\_020985), jednu senzor histidin kinazu (SRIM\_027850), transkripcijski regulator FadR (SRIM\_021640) i jedan protein koji sadrži VWA domenu (SRIM\_014225). Osim toga, druge kategorije ("Stanični odgovor na stres", "Primarni metabolizam" i "Stanični ciklus i dioba") bile su zastupljene s manjim brojem proteina. Na primjer, identificirana su dva fosforilirana proteina koja sudjeluju u staničnom odgovoru na stres s TerD domenom (SRIM\_012680 i SRIM\_020400) i dva fosforilirana proteina u kategoriji "Primarni metabolizam" (engl. *DNA-directed RNA polymerase subunit beta*, RpoB, SRIM\_018645; i timidilat kinaza, dTMP, SRIM\_023100). U ovoj fazi je također identificirana povećana razina fosforilacije za tri proteina koji pripadaju kategoriji "Stanični ciklus i dioba" (SRIM\_014620; SRIM\_015590; SRIM\_026815).

#### 4.3.2.3. Fosforilacija proteina u SIII fazi

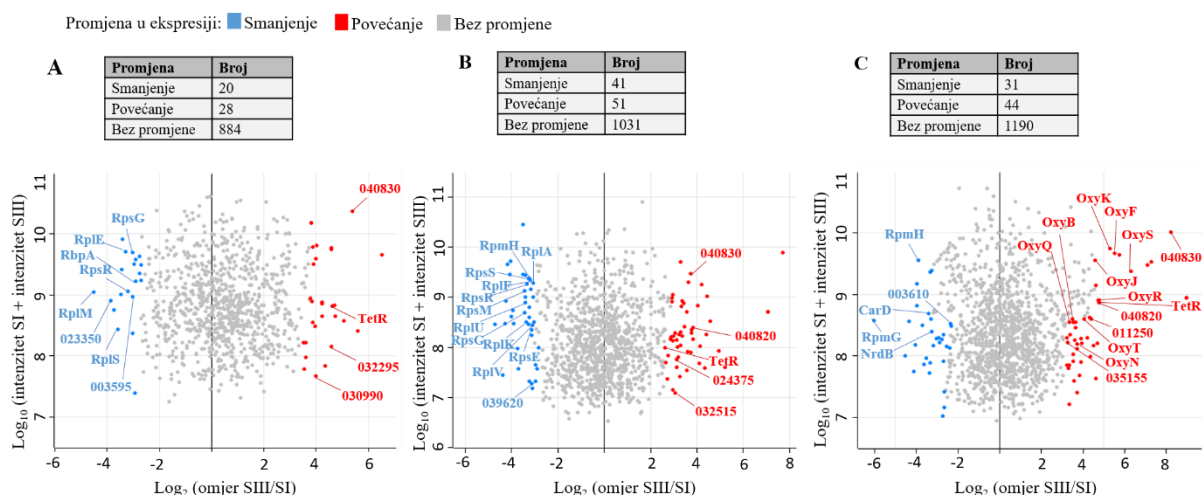
U fazi SIII, većina diferencijalno povećanih mjesta fosforilacije pripada proteinima iz kategorija "Nepoznato" (6), "Primarni metabolizam" (6) i "Stanični odgovor na stres" (5). Identificirana su tri ribosomska proteina s povećanom fosforilacijom (30S ribosomalni proteini S16, SRIM\_029570 i S17, SRIM\_018535 i 50S ribosomalni protein L31, SRIM\_028075). Što se tiče proteina koji sudjeluju u odgovoru na stres, identificiran je fosforilirani Dps protein (protein koji štiti DNA u uvjetima gladovanja, SRIM\_030245), kao i ko-šaperon GroES (SRIM\_018295). Osim toga, u ovoj kategoriji je identificiran jedan protein iz porodice TerD (SRIM\_024465), "cold-shock" protein (SRIM\_019050), koji bi mogao sudjelovati u

oksidativnoj toleranciji na stres (62) i protein koji veže DNA - Hu (SRIM\_015460), koji može zaštititi kromosom kao odgovor na stres (63). Konačno, identificirana su 4 proteina koji pripadaju kategoriji "Nepoznato" koji su ujedno pokazali najviše razine diferencijalne fosforilacije (SRIM\_019790, SRIM\_010030, SRIM\_021080 i SRIM\_007840).

Navedeni proteini su imali povećane razine fosforilacije samo u jednoj fazi rasta, a njihova povezanost s fiziološkim stanjem bakterije u kojem su detektirani raspravljena je u poglavlju Diskusija. Važno je također napomenuti da je znatan dio proteina imao povećanu fosforilaciju na više mjesta u više od jedne faze, kao što se vidi na Slici 24A.

#### 4.3.3. Kvantitativna analiza proteoma soja 23383

Kao što je prikazano u podpoglavljju 4.2.3., kvalitativnom analizom proteoma soja 23383 bakterije *S. rimosus* identificirano je ukupno 2875 proteina. U eksperimentu 1, replikati su pokazali relativno slabe korelacije, stoga se za statističku analizu nije koristio t-test, nego tzv. Značajnost B (engl. *significance B*) (s p-vrijednošću 0,05) za svaki replikat odvojeno. U ovom eksperimentu ukupno je kvantificirano 1583 proteina koji su podvrgnuti statističkoj analizi. S obzirom da su jedino proteini s omjerima izmjerenim između faza SIII i SI pokazali relativno dobru korelaciju (0,6-0,7), ovdje će se prikazati rezultati analize "significance B" samo za taj omjer za tri biološka replikata zasebno (Slika 25).



**Slika 25.** Distribucija diferencijalno reguliranih mjesta fosforilacije između faza SIII i SI soja 23383 u tri biološka replikata (A, B i C). Crveni krugovi predstavljaju proteine sa značajno povećanom, dok plavi krugovi predstavljaju proteine sa značajno smanjenom ekspresijom.



Proteini koji su pokazali značajnu promjenu u ekspresiji u barem jednom od tri replikata su objedinjeni i dodijeljeni fazama SI (ukupno 79 proteina) i SIII (ukupno 101 protein), te je napravljena njihova raspodjela po funkcionalnim podkategorijama iz programa eggNOG (Slika 27A). Lista svih proteina dodijeljenih fazama SI i SIII nalazi se u Tablicama P 3A i 3B.

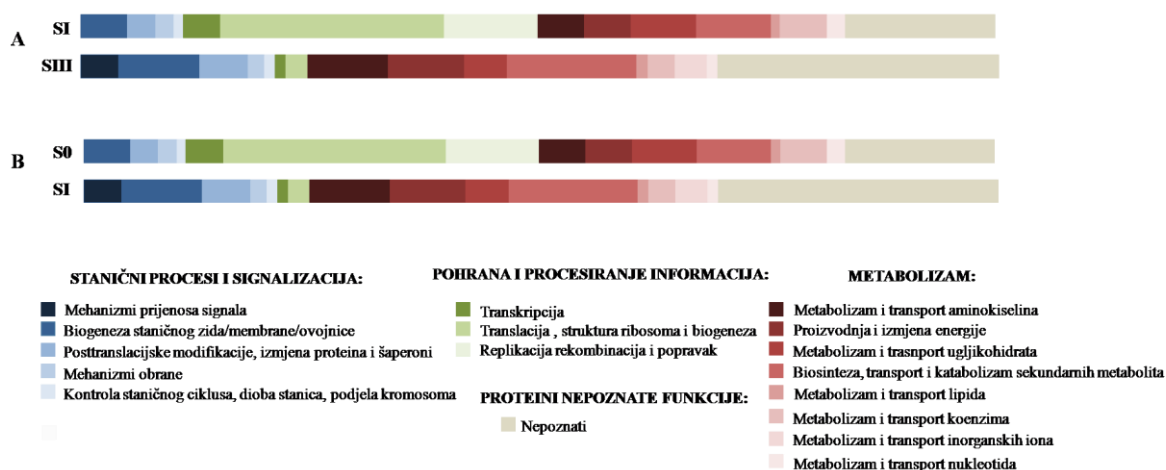
Iz raspodjele se vidi kako je u određenim funkcionalnim kategorijama došlo do bitnih promjena između faza SI i SIII. Na razini glavnih kategorija, najzastupljenija kategorija u SI je "Pohrana i procesiranje informacija" (40,5%), čiji se udio značajno smanjuje u SIII (4%). Sljedeća kategorija u SI je "Metabolizam" (35,4%), koja se povećava u SIII (55,4%). Druga najzastupljenija kategorija u SIII su "Proteini nepoznate funkcije" (27,7%), čiji je udio samo 7,6% u SI fazi.

U fazi SI su s najvećim postotkom zastupljeni proteini iz podkategorije "Translacija, struktura ribosoma i biogeneza" (30,4%), dok se njihov broj drastično smanjio u SIII fazi (2%). U ovoj su podkategoriji 24 ribosomska proteina 50 ili 30S (npr. RpsP, RplX, RplF, RpsG) pokazala značajno povećanje u ekspresiji (označeni na Slici 25) u SI, a u SIII ekspresija niti jednog ribosomskog proteina nije bila povećana.

Proteini koji sudjeluju u transkripciji su bili prevalentniji u SI fazi (6,3%), dok ih u SIII gotovo nije bilo (1%). U fazi SI značajno povećanu ekspresiju imali su LexA (SRIM\_030475) i CarD (SRIM\_024360), transkripcijski regulatori koji sudjeluju u odgovoru na stres, i FmdB, transkripcijski regulator čija uloga još nije razjašnjena, te protein RbpA koji vezuje RNA-polimerazu i dva "cold-shock" proteina. Od transkripcijskih regulatora u fazi SIII je značajno povećanu ekspresiju imao TetR, kao i kod soja G7 (Slika 25, Tablica P 3B), te protein TraR/DksA.

Unutar kategorije "Metabolizam", najveće se promjene vide u proteinima koji sudjeluju u sekundarnom metabolizmu, koji su zastupljeniji u SIII (16,8%) nego u SI (6,3%), i čine drugu najzastupljeniju podkategoriju u SIII. Među njima se nalazi 9 proteina iz klastera za OTC (OxyB, OxyF, OxyS, OxyJ, OxyR, OxyT, OxyN, OxyQ i OxyK), te još neki proteini povezani sa sekundarnim metabolizmom, kao npr. dva proteina s domenom za adenilaciju aminokiselina (SRIM\_040830 i SRIM\_030990), dva proteina iz porodice oksidoreduktaza (SRIM\_040820 i SRIM\_032515) i dr. (Tablica P 3B). S druge strane, u fazi SI je pet proteina povezanih sa sekundarnim metabolizmom imalo značajno povećanu ekspresiju: dvije neribosomalne peptid sintetaze (SRIM\_003595 i SRIM\_003610), poliketid sintaza tipa (SRIM\_039620), NAD(P)H:kvinon oksidoreduktaza (SRIM\_023350) i "acyl carrier protein" (SRIM\_020350).





**Slika 27.** Raspodjela značajno promijenjenih proteina po funkcijama. (A) Faze SI (N=79) i SIII (N=101). (B) Faze S0 (N=99) i SI (N=171).

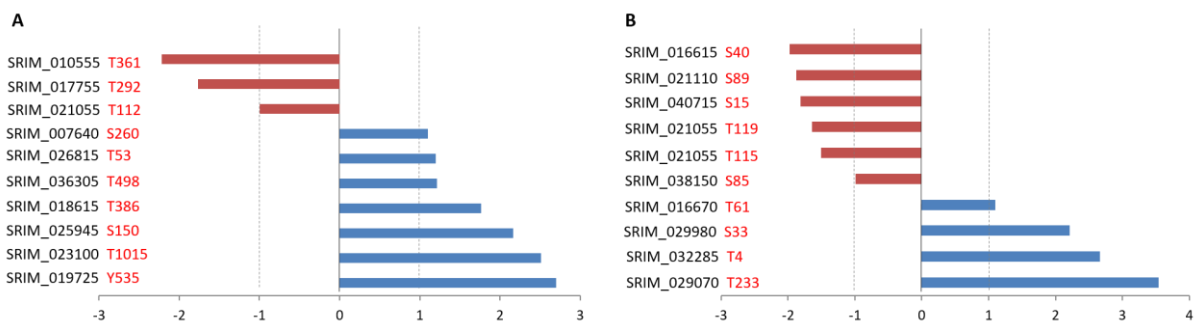
U fazi S0, podjednako su bile zastupljene kategorije "Pohrana i procesiranje informacija" (39,8%) i "Metabolizam" (32,6%). Udio kategorije "Pohrana i procesiranje informacija" u SI je smanjen na 4%, a prevalentna kategorija u SI je "Metabolizam" (44%). Kategorije "Stanični procesi i signalizacija" te "Proteini nepoznate funkcije" su povećani u fazi SI (21% odnosno 30%) u odnosu na S0 (11% odnosno 17%).

Podkategorija s najdrastičnijom promjenom je i u ovoj analizi bila "Translacija, struktura ribosoma i biogeneza", koja je u S0 fazi prevalentna (24,2%). Proteini iz ove podkategorije su znatno manje bili eksprimirani u fazi SI (2,9%). Svi proteini s povećanom ekspresijom u S0 u ovoj podkategoriji su 50 i 30S ribosomski proteini (ukupno 24 proteina; Slika 27, Tablica P 4A), dok su u SI povećanu ekspresiju imali proteini iz porodica DinB (SRIM\_003970) i RidA (SRIM\_004310), te tRNA pseudouridin sintaza TruD (SRIM\_001215) i hipotetski protein (SRIM\_004825) povezan s ovom podkategorijom. Većina ovih proteina ima ulogu u odzivu na stres. Sljedeća najzastupljenija podkategorija u SI je "Sekundarni metabolizam" (15,8%). U odnosu na S0 fazu, proteini iz sekundarnog metabolizma su znatno aktivniji, a na Slici 27 se vidi da je znatan broj proteina iz klastera za OTC aktivan. Ovo potvrđuje dosadašnje spoznaje da je aktivacija sekundarnog metabolizma u korelaciji sa zastojem u rastu tijekom faze SI kod streptomiceta. Proteini koji sudjeluju u replikaciji su zastupljeni u S0 s 10%, dok u SI fazi nijedan protein koji sudjeluje u replikaciji nije imao značajno povećanu ekspresiju. Neki od tih proteina s povećanom ekspresijom u fazi S0 su primjerice DNA polimeraze DnaJ i DnaX, tri helikaze (HrpA, RecQ i helikaza s DEAD/DEAH kutijom), DNA primaza i sl.

#### 4.3.4. Kvantitativna analiza fosfoproteoma soja 23383

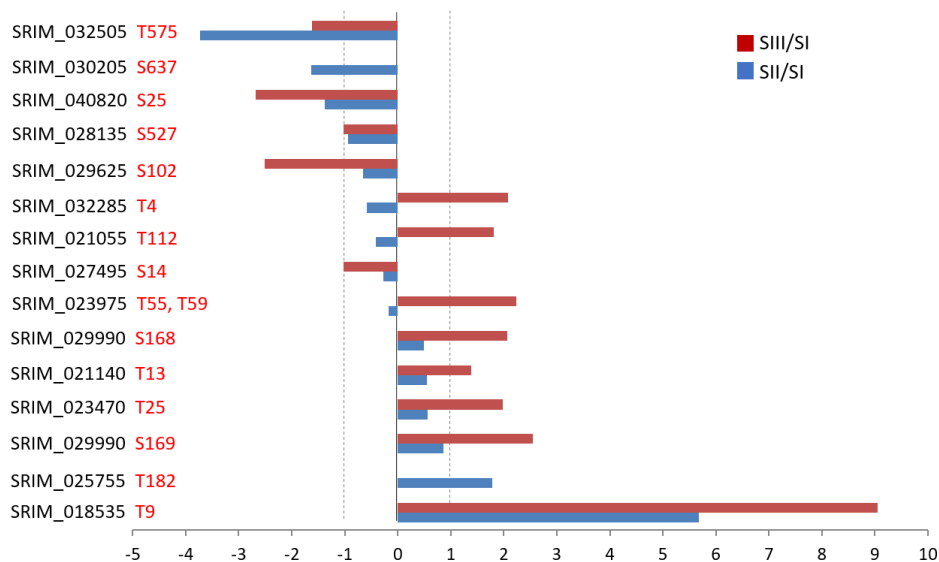
U fosfoproteomu soja 23383 je kvantificiran puno manji broj proteina u odnosu na divlji soj. Nakon normalizacije na odgovarajuće omjere nefosforiliranih proteina, sveukupno je kvantificirano samo 98 proteina s jednim ili više mjesta fosforilacije. Mogući razlozi ovih manjih brojeva bit će raspravljeni u poglavlju Diskusija. S obzirom na ovako mali broj kvantificiranih mjesta fosforilacije, za identifikaciju značajno promijenjenih fosfoproteina je odabran niži prag promjene nego za divlji soj, 1 na  $\log_2$  skali, što odgovara promjeni od 2 puta (engl. *2-fold change*). Slični arbitrarni prag primjenjen je i u nekim drugim objavljenim studijama<sup>26</sup>.

Slika 28A prikazuje značajno promijenjena mjesta fosforilacije između SI i S0, pri čemu plave crte predstavljaju proteine s povećanom razinom fosforilacije u SI, a crvene crte predstavljaju proteine s povećanom razinom fosforilacije u S0 (ST kinaza, SRIM\_010555; D-alanil-D-alanin karboksipeptidaza koja sudjeluje u staničnoj diobi, SRIM\_017755; i ‘DNA-vezujući protein’, SRIM\_021055). Proteini s povećanom razinom fosforilacije u SI vide se i na slici 28B (crvene crte). Zanimljivo je to da je u SI, unatoč malom broju proteina, čak jedna trećina proteina koji sudjeluju ili mogu sudjelovati u staničnom odgovoru na stres (jedan iz CsbD porodice proteina, SRIM\_040715; DEAD-DEAH BOX helikaza, SRIM\_019725; dTMP kinaza, SRIM\_023100; i alfa podjedinica proteasoma, SRIM\_007640). U ovoj fazi također je povećana fosforilacija na tri proteina koja sudjeluju u sekundarnom metabolizmu, od čega je jedan iz klastera za biosintezu OTC-a (OxyC, SRIM\_038150).



**Slika 28.** Dinamika diferencijalno fosforiliranih proteina u soju 23383 tijekom dvije faze rasta. Dijagram prikazuje mjesta fosforilacije (crvena slova) koja su prošla prag promjene od 1 na  $\log_2$  skali (označeno isprekidanim okomitim linijama) u najmanje jednom biološkom eksperimentu u SI/S0 (A) i SII/SI (B).

Što se tiče faze SII, u ovoj fazi je izmjeren najmanji broj proteina s povećanom fosforilacijom: 30S ribosomski protein S17, SRIM\_018535; 30S ribosom-vezujući faktor RbfA, SRIM\_029980; dva hipotetska proteina SRIM\_016615 i SRIM\_016670, kao i dva proteina domenom DUF, SRIM\_029070 i SRIM\_032285 (Slika 28B i 29).



**Slika 29.** Dinamika diferencijalno fosforiliranih proteina u soju 23383 tijekom SI i SII ili SIII faze rasta. Dijagram prikazuje mjesta fosforilacije (crvena slova) koja su prošla prag promjene od 1 na log<sub>2</sub> skali (označeno isprekidanim okomitim linijama) u najmanje jednom biološkom eksperimentu u SII/SI i SIII/SI.

U fazi SIII je osam proteina, s ulogama u primarnom metabolizmu ili nepoznatih uloga, imalo povećanu fosforilaciju (Slika 29 – crvene crte s desne strane). Iz primarnog metabolizma to su riboflavin kinaza (SRIM\_029990), difosfokinaza (SRIM\_023470) i 30S ribosomski protein S17 (SRIM\_018535), koji se posebno ističe po tome što je njegova fosforilacija povećana skoro 500 puta u ovoj fazi u odnosu na SI, što je najviše u cijelom setu podataka za oba soja. Fosforilacija ovog proteina također je povećana nekih 50 puta u SII fazi. Preostali proteini s povećanom fosforilacijom su tri hipotetska (SRIM\_023975, SRIM\_025755 i SRIM\_027495) te jedan s domenom DUF (SRIM\_032285), i DNA-vezujući protein (SRIM\_021055) čija je ekspresija i u SI povećana. Unatoč malom broju, iz rezultata se uočava da u soju 23383 u fazi SI prevladava fosforilacija stresnih proteina i onih iz sekundarnog metabolizma, dok je fosforilacija proteina nepoznate uloge primijećena u većem broju u SII i SIII.

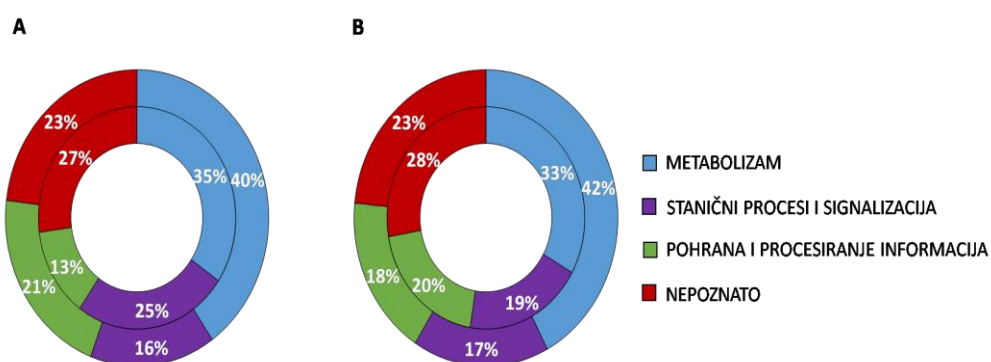
#### 4.4. Usporedba proteoma i fosfoproteoma bakterije *S. rimosus*, sojeva G7 i 23383

U proteomu soja G7 identificirano je 3725 proteina, dok je u proteomu soja 23383 identificirano 2875 proteina, od čega je 2547 proteina identificirano u oba soja. U fosfoproteomu soja G7 identificirano je 230 fosforiliranih proteina, dok je u fosfoproteomu soja 23383 identificirano 288 proteina, od čega je 85 pronađeno u oba soja (Slika 30).



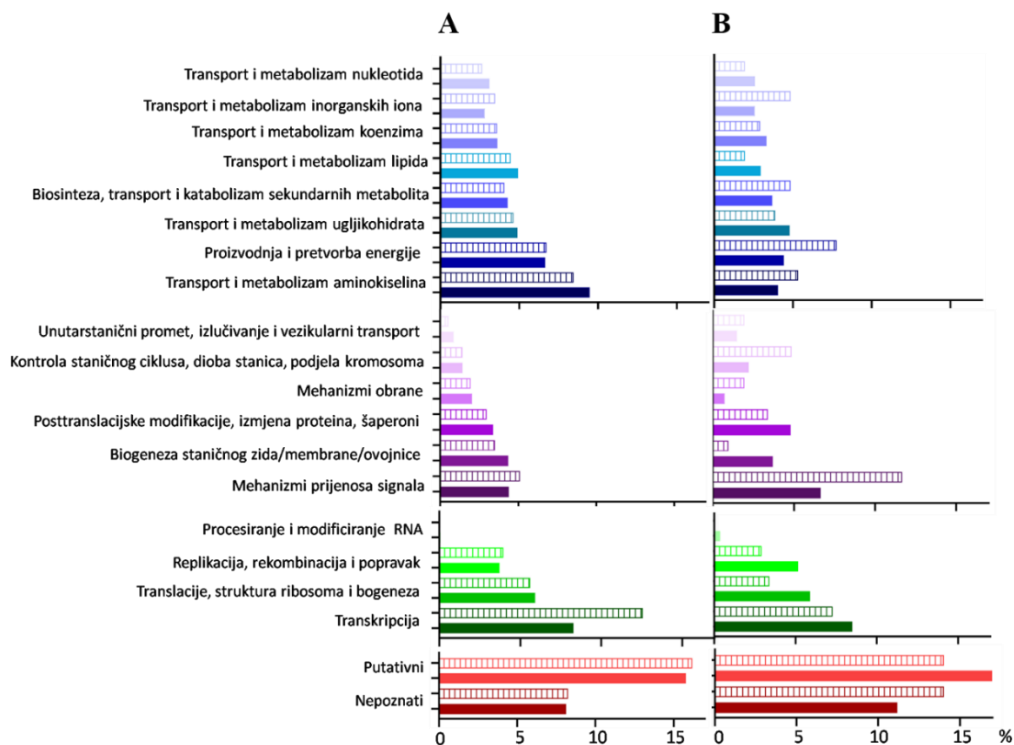
**Slika 30.** Usporedba identificiranih (fosfo)proteina između sojeva G7 i 23383. Usporedbe proteoma su prikazane na lijevoj strani slike, dok su usporedbe fosfoproteoma dvaju sojeva prikazane na desnoj strani slike.

Funkcionalna anotacija svih identificiranih (fosfo)proteina napravljena je pomoću programa eggNOG mapper. Njihova raspodjela u glavne funkcionalne kategorije prikazana je na Slici 31, dok je detaljan uvid u 20 podkategorija prikazan na Slici 32. Za ovu analizu korišteni su samo proteini koji su dodijeljeni jednoj funkcionalnoj kategoriji (tj. 97-98% proteoma i 94-95% fosfoproteoma u oba soja) što nije značajno promijenilo broj identificiranih (fosfo)proteina.



**Slika 31.** Raspodjela identificiranih (fosfo)proteina u glavne funkcionalne kategorije. (A) Vanjski krug predstavlja udjele funkcionalnih kategorija proteina identificiranih u soju G7 (3628 proteina), a unutarnji krug identificiranih fosfoproteina (214 fosfoproteina). (B) Vanjski krug predstavlja postotke funkcionalnih kategorija proteina identificiranih u soju 23383 (2814 proteina), a unutarnji krug identificiranih fosfoproteina (274 proteina).

Kao što je prikazano na Slici 31, najčešća kategorija u proteomu, kao i u fosfoproteomu u oba soja je "Metabolizam", a zatim "Proteini nepoznate funkcije". Nakon toga slijede kategorije "Pohrana i procesiranje informacija" i "Stanični procesi i signalizacija" u proteomu oba soja, a bitnije razlike među njima vide se u navedenim kategorijama u fosfoproteomu. U fosfoproteomu soja G7, kategorija "Stanični procesi i signalizacija" je zastupljena s 25%, što je znatno povećanje u odnosu na proteom (16%), dok je kategorija "Pohrana i procesiranje informacija" smanjena u proteomu na 13% (s 21%). S druge strane, u fosfoproteomu soja 23383, ove dvije kategorije su podjednako zastupljene. Detaljnija analiza podkategorija u ove dvije kategorije (Slika 32), pokazala je da su sve tri podkategorije zastupljenije u soju 23383 ("Replikacija, rekombinacija i popravak", "Transkripcija" i "Translacija, struktura ribosoma i biogeneza") zbog čega je povećana kategorija "Pohrana i procesiranje informacija" u odnosu na soj G7. Što se tiče kategorije "Stanični procesi i signalizacija", ona je u soju G7 povećana najviše na temelju podkategorija "Mehanizmi prijenosa signala" i "Kontrola staničnog ciklusa, dioba stanica, podjela kromosoma", dok se znatnije povećanje u soju 23383 vidi u podkategoriji "Biogeneza staničnog zida/membrane/ovojnice".



**Slika 32.** Raspodjela identificiranih (fosfo)proteina u funkcionalne podkategorije. (A) Udio funkcionalnih kategorija proteina identificiranih u soju G7 i 23383. (B) Udio funkcionalnih kategorija fosfoproteina identificiranih u soju G7 i 23383. Pune crte predstavljaju (fosfo)proteine soja 23383, a isprekidane (fosfo)proteine soja G7.

Kao što je ranije navedeno, svi proteini sa sličnim ulogama su radi pojednostavljenja interpretacije rezultata i mogućnosti dobivanja uvida u globalne trendove na temelju funkcija podijeljeni u 6 funkcionalnih kategorija. Unutar ovih kategorija, najveći dio proteina u oba soja grupirao se unutar 3 kategorije: "Primarni metabolizam", "Regulatorni proteini" i "Proteini nepoznate funkcije".

#### 4.4.1. Primarni metabolizam

U kategoriji primarni metabolizam identificirani su brojni fosforilirani proteini koji sudjeluju u translaciji, elongacijski faktori, DNA/RNA polimeraze, transporteri, proteini koji sudjeluju u procesima kao što su glikoliza/glukoneogeneza, citratni ciklus, biosinteza aminokiselina itd. Budući da za ovaj rad ova kategorija nije od primarnog interesa detaljan popis proteina pronađen kod oba soja te u svakom zasebno s naznačenim mjestima fosforilacije je prikazan u Tablici P 5. Jedino je u slučaju ribosomskih proteina uočen povećan broj identificiranih fosfoproteina u soju 23383 (faktor inicijacije translacije IF-3, 30S ribosomski protein S9, S14 i S18 te 50S ribosomski protein L10). Preostali ribosomski proteini identificirani su kod oba soja (50S ribosomski protein L31 i L20, 30S ribosomski protein S16 i S17 te 30S ribosom-vezujući faktor RbFA).

#### 4.4.2. Stanični ciklus i dioba

Detaljan pregled fosforiliranih proteina i njihovih mjesta fosforilacije identificiranih u sojevima G7 i 23383 dan je u Tablici P 6. Kao što se vidi, većina njih je pronađena u soju G7, a u oba soja je pronađeno 7 proteina (iz porodica DivIVA, FtsK, SepF, FtsH itd.). U soju G7 je pronađen puno veći broj proteina iz ove skupine (11) nego u soju 23383 (3).



#### 4.4.3. Sekundarni metabolizam

S obzirom na cilj ovih istraživanja koja su fokusirana na detekciju regulatornih mehanizama i proteina koji sudjeluju u biosintezi sekundarnih metabolita, posebno su izdvojeni proteini kategorije "Sekundarni metabolizam". U ovu kategoriju su svrstani svi proteini koji sudjeluju u proizvodnji, transportu ili katabolizmu sekundarnih metabolita (Tablica 14). Ukoliko su identificirani proteini koji reguliraju biosintezu sekundarnih metabolita, oni su svrstani u kategoriju regulatornih proteina s naznakom da reguliraju biosintezu sekundarnih metabolita. Kao što je prikazano u Tablici 14, u oba soja je identificirana fosforilacija na pet proteina: tri iz porodice SDR oksidoreduktaza, a dva iz porodice NRPS (engl. *non-ribosomal peptide synthetase*). Među njima se ističe SRIM\_040820 (iz porodice SDR oksidoreduktaza) i SRIM\_040830, jer su smješteni najvjerojatnije unutar istog klastera i nemaju ortologe u *S. coelicolor*, pa bi mogli imati važnu i specifičnu ulogu u proizvodnji antibiotika u *S. rimosus*. Također je za protein SRIM\_040820 je zabilježena i povećana razina fosforilacije tijekom faze SI u oba soja.

Samo u soju G7 fosforilirano je pet proteina koji sudjeluju u sekundarnom metabolizmu, dok je puno veći broj (14) ovih proteina fosforiliran u soju 23383. Ono što je posebno zanimljivo je da su čak 4 proteina iz klastera za biosintezu OTC-a fosforilirana u soju koji proizvodi visoke koncentracije OTC-a: SRIM\_038150 (OxyC), jedan od tri minimalne poliketid sintaze, SRIM\_038130 (OxyG/H) i SRIM\_038110 (OxyL) koji sudjeluju u sintezi i modifikaciji poliketidne okosnice. Također je fosforiliran protein SRIM\_038060 (OtcG), jedan od tri transkripcijska faktora smještenih unutar klastera koji direktno reguliraju biosintezu OTC-a povećavajući ekspresiju gena iz klastera.

**Tablica 14.** Pregled proteina iz sekundarnog metabolizma i njihovih mjesta fosforilacije u sojevima G7 i 23383. Crvena slova predstavljaju mjesta fosforilacije, a masno podebljanim slovima označeni su proteini iz klastera za OTC.

Broj lokusa	Ime proteina na engl. jeziku	Mjesto fosforilacije	AA	G7	23383
SRIM_028925	SDR family oxidoreductase	TLAANLL <b>S</b> PAELTR T <b>L</b> AA <b>N</b> LL <b>S</b> PAELTR TLAANLL <b>S</b> PAEL <b>T</b> R TATPMQ <b>E</b> SVFRQ <b>E</b> GR	S107 T100 T112 S184	+ + + -	+ + + +

SRIM_037420	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase	VQPT <b>T</b> L <b>F</b> ALQV <b>A</b> L <b>T</b> ALWR VQPT <b>L</b> FALQV <b>A</b> L <b>T</b> ALWR DVAY <b>T</b> LAVRR DVAY <b>T</b> LAVRR	T590 T599 T477 Y476	+	-
SRIM_039505	non-ribosomal peptide synthetase	ALT <b>S</b> EPARRR V <b>S</b> RIPNAR ALT <b>S</b> EPARRR	S892 S796 T891	+	+
SRIM_040820	SDR family oxidoreductase	AVLV <b>T</b> GA <b>S</b> SGLGR	S25	+	+
SRIM_040830	amino acid adenylation domain- containing protein	AAP <b>L</b> TTGASGD <b>T</b> IAPR	T2032	+	+
SRIM_022485	class I SAM- dependent methyltransferase	A <b>E</b> SLRMEFFDIGAVI <b>Y</b> FLR A <b>E</b> SLRMEFFDIGAVI <b>Y</b> FLR	S192 Y205	+	-
SRIM_034035	non-ribosomal peptide synthetase	<b>T</b> TGADEALLSFPVDGR <b>T</b> TGADEALLSFPVDGR	T268 T269	+	-
SRIM_023135	non-ribosomal peptide synthetase	GT <b>V</b> GDIEI <b>H</b> SADARTALLETG R	S1976	+	-
SRIM_023985	cytochrome P450	FEA <b>I</b> TQIPNCV <b>Y</b> VLTR FEA <b>I</b> TQIPNCV <b>Y</b> VL <b>T</b> R FEA <b>I</b> TQIPNCV <b>Y</b> VLTR	T249 T259 Y256	+	-
SRIM_001445	amino acid adenylation domain- containing protein	E <b>Y</b> LGRPAMTAER	Y1847	+	-
SRIM_007990	cytochrome P450	<b>S</b> VFYGVFSPEGSQR <b>S</b> VF <b>Y</b> GVFSPEGSQR	S56 Y59	-	+
SRIM_003605	non-ribosomal peptide synthetase	DLLGAPALGTADNFAAAGGN <b>S</b> LSTAR	S586	-	+
SRIM_004165	CocE/NonD family hydrolase	DQ <b>G</b> S <b>G</b> T <b>P</b> PPQK	S611	-	+
SRIM_005855	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase	FDGMRSAP <b>L</b> SHHR	S1185	-	+
SRIM_020255	aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate- dependent enzyme	DL <b>S</b> LLQVRMR	S144	-	+
SRIM_024375	PPOX class F420- dependent oxidoreductase	AVAL <b>S</b> DDLK	S6	-	+

SRIM_030915	non-ribosomal peptide synthetase	TVVGM <b>L</b> AALR	T67	-	+
SRIM_031100	cytochrome P450	AIAD <b>T</b> GIDTLMAR AIAD <b>T</b> GID <b>T</b> LMAR	T352 T356	- -	+ +
SRIM_036305	non-ribosomal peptide synthetase	ALF <b>D</b> A <b>E</b> T <b>V</b> ER	T498	-	+
<b>SRIM_038110</b>	NAD(P)-binding protein	GHAREELL <b>D</b> <b>T</b> <b>Y</b> AAER	Y331	-	+
<b>SRIM_038130</b>	AMP-binding protein	T <b>E</b> T <b>F</b> Q <b>Q</b> A <b>V</b> <b>S</b> E <b>V</b> K	S624	-	+
<b>SRIM_038150</b>	acyl carrier protein	AL <b>R</b> T <b>E</b> <b>T</b> <b>F</b> Q <b>Q</b> A <b>V</b> <b>S</b> E <b>V</b> K	T618	-	+
SRIM_038780	type I polyketide synthase	AL <b>I</b> E <b>M</b> T <b>N</b> A <b>S</b> L <b>T</b> G <b>A</b> S <b>P</b> <b>S</b> A <b>G</b> G <b>A</b> A R	S87	-	+
SRIM_040065	beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein	STA <b>A</b> <b>S</b> <b>D</b> P <b>A</b> L <b>K</b>	S30	-	+

#### 4.4.4. Stanični odgovor na stres

U ovu kategoriju proteina svrstani su svi proteini koji sudjeluju ili mogu sudjelovati u staničnom odgovoru na stres, neovisno o tipu stresa ("cold-shock" proteini, helikaze, šaperoni itd). Slično kao u kategoriji "Sekundarni metabolizam", daleko veći broj proteina koji sudjeluju ili mogu sudjelovati u staničnom odgovoru na stres je fosforiliran u soju 23383. U divljem soju G7 je pronađeno šest fosforiliranih proteina, a u 23383 čak 16 (Tablica 15). U oba soja je fosforilirano osam proteina. Najzastupljenija je porodica TerD proteina, čiji su različiti proteini fosforilirani u oba soja. Jedan protein iz porodice TerB koji je također fosforiliran u oba soja nije dosad pronađen u fosforiliranom obliku niti u jednoj vrsti bakterija. Posebno su zanimljiva dva proteina iz porodice CsbD, za koje se zna da sudjeluju u odgovoru na stres, ali im uloga još nije razjašnjena. Ova dva proteina su fosforilirana samo u soju 23383, a za jednog od njih nikad prije nije pronađena fosforilacija (SRIM\_040715), dok je za drugog pronađena samo u dva organizma iz reda Firmicutes (SRIM\_006040), što je provjereno u bazi dbPSP. U soju 23383 pronađen je velik broj penicilin vezujućih proteina, a posebno zanimljivi su protein iz FUSC porodice te protein DinB.

**Tablica 15.** Pregled proteina koji sudjeluju u staničnom odgovoru na stres i njihovih mjesta fosforilacije u sojevima G7 i 23383. Crvena slova predstavljaju mjesta fosforilacije.

Broj lokusa	Ime proteina na engl. jeziku	Mjesto fosforilacije	AA	G7	23383
SRIM_009140	Asp23/Gls24 family envelope stress response protein	TESAQGNRPEPR TESAQGNRPEPR	T2 S4	+ +	+ -
SRIM_010835	PspA/IM30 family protein	ATYTAAQAQTR QAIEGGQASQGQQAPQAQPGQPR ATYTAAQAQTR	T151 S248 T145	+ + -	- + +
SRIM_012680	TerD family protein	GGNVSLTK GGNVSLTK	S12 T145	+ -	+ +
SRIM_015460	integration host factor	NPQTGDPIQIPAGYSVK MNRSELVAALADR NPQTGDPIQIPAGYSVK	S77 S4 T66	+ - -	+ + +
SRIM_018295	co-chaperone GroES	IVVQPLDAEQTTASGLVIPDTAK IVVQPLDAEQTTASGLVIPDTAK IVVQPLDAEQTTASGLVIPDTAK	T27 T28 S30	+ + +	+ + +
SRIM_019050	cold-shock protein	GFGFIAQDGGGPDVHVHYSAINASGFR GFGFIAQDGGGPDVHVHYSAINASGFR	T37 S32	+ -	+ +
SRIM_020395	TerB family tellurite resistance protein	DSAQTMQNQLVAK	T35	+	+
SRIM_029330	HU family DNA-binding protein	GSLSGGTSTR GSLSGGTSTR GSLSGGTSTR	S110 S114 T113	+ - +	+ + +
SRIM_030245	DNA starvation/stationary phase protection protein	TSGIDTVQDSWIK TSGIDTVQDSWIK ASAIGVSPDGRAETVSK	T88 T93 T84	+ + -	+ + +
SRIM_013125	general stress protein	GGHESGGNFANDPQRASEAGQK GGHESGGNFANDPQR GGHESGGNFANDPQRASDAGQK QGGHESGGNFANDPQRASEVGQK	S63 S29 S85 S41	+ + + +	- - - -
SRIM_020400	TerD family protein	GGNVSLSK	S12	+	-
SRIM_021705	copper resistance protein CopC/CopD	EAGEATGQVEQGR	T312	+	-

SRIM_024465	TerD family protein	IVFPVSIYDAENRSQNFGQVR	S118	+	-
SRIM_040715	CsbD family protein	VQQLSGSIK	S15	-	+
SRIM_000295	molecular chaperone DnaK	TARSVKR	S68	-	+
SRIM_001465	penicillin-binding protein	TPVTPATVYDGNNK	T405	-	+
SRIM_006040	CsbD family protein	ENAQGMRD <del>SLK</del>	S57	-	+
SRIM_009370	TerD family protein	NQ <del>T</del> VSLVK	T242	-	+
SRIM_013825	penicillin-binding protein 2	SDQIGRSGLERTYDSQLR SDQIGRSGLERTYDS <del>Q</del> LR SDQIGRSGLERTYDSQLR	S216 S224 T221	- - -	+ + +
SRIM_013900	trigger factor	INQQV <del>T</del> VK	T40	-	+
SRIM_014560	penicillin-binding protein	TAVSGTGARAMAGLGGDIGAK TAVSGTGARAMAGLGGDIGAK TAVSG <del>T</del> GARAMAGLGGDIGAK	S478 T475 T480	- - -	+ + +
SRIM_015120	penicillin-binding protein	VNRENVPLSQVPKTTQEAVLAAEDR VNRENVPLSQVPK <del>T</del> TQEAVLAAEDR	S129 T134	- -	+ +
SRIM_018290	chaperonin GroEL	NQGFNAATGEYGD <del>L</del> VK	T482	-	-
SRIM_020140	molecular chaperone DnaK	LKGEDTAEIRTATEK	T552	-	+
SRIM_012325	DinB family protein	LSEQSVPPSGMSLHGLIR	S71	-	+
SRIM_034425	FUSC family protein	LAASLMELR	S556	-	+

#### 4.4.5. Regulatorni proteini

Unutar kategorije regulatorni proteini pronađen je znatan broj fosforiliranih proteina, posebice transkripcijskih regulatora u oba soja (Tablica 16). Ovo je iznenađujuće s obzirom na njihovu malu koncentraciju u stanici, unatoč brojnosti ove kategorije proteina kod roda bakterije *Streptomyces*. Proteini su podijeljeni u tri tablice s obzirom na njihove regulatorne funkcije: transkripcijski regulatori, STY kinaze i fosfataze te histidin kinaze i fosfataze. Pronađen je znatan broj transkripcijskih regulatora u oba soja zasebno, a samo je jedan zajednički u oba soja. Različiti homolozi iz porodica MarR i TetR su pronađeni u oba soja, proteini iz porodica FadR, Lrp/AsnC i CarD su pronađeni samo u G7, dok su samo u 23383 pronađeni proteini iz porodica MerR, PucR, NdgR, DeoR/GlpR, WhiB, LacI i PadR. Među njima, PucR (SRIM\_029080) je regulator koji prema eggNOG anotaciji sudjeluje i u sekundarnom metabolizmu, dok je protein SRIM\_038060 regulator koji se nalazi u klasteru za biosintezu OTC-a. Što se tiče kinaza, četiri su detektirane u oba soja (SRIM\_014215, SRIM\_010555, SRIM\_007050 i SRIM\_017990), dok je samo SRIM\_019945 fosforilirana u soju 23383 (Tablica P 7). Samo u soju G7 detektirana je fosforilacija na još osam kinaza (SRIM\_002990, SRIM\_015580, SRIM\_018190, SRIM\_020795, SRIM\_020800, SRIM\_021000, SRIM\_021190 i SRIM\_025105).

**Tablica 16.** Pregled regulatornih proteina i njihovih mjesta fosforilacije u sojevima G7 i 23383. Crvena slova predstavljaju mjesta fosforilacije, a masno podebljanim slovima označen je protein iz klastera.

Broj lokusa	Ime proteina na engl. jeziku	Mjesto fosforilacije	AA	G7	23383
SRIM_021670	Lrp/AsnC family transcriptional regulator	ALYTYLT <b>T</b> R ALY <b>T</b> YL <b>T</b> R ALYTYLT <b>T</b> R	T305 T301 T304	+ + -	+ + +
SRIM_002125	helix-turn-helix transcriptional regulator	<b>T</b> VGQTPGGYRATARGTADWQR TVGQTPGGYRA <b>T</b> ARGTADWQR TVGQTPGGYRATARG <b>T</b> ADWQR	T236 T247 T251	+ + +	- - -
SRIM_007210	arginine repressor	TEAQDNE <b>T</b> LHGGPAVPQTR	T9	+	-
SRIM_007275	response regulator transcription factor	VLVLTTFDLDE <b>Y</b> VYEALR VLVLTTFDLDE <b>Y</b> VYEALR VLVL <b>T</b> FDLDEYVYEALR VLVL <b>T</b> FDLDEYVYEALR	Y93 Y95 T86 T87	+ + + +	- - - -

SRIM_014460	MarR family transcriptional regulator	TDRRLW <b>S</b> YK TDRRLW <b>S</b> YK TDRRLW <b>S</b> YK	S8 T2 Y9	+	-
SRIM_015385	transcriptional regulator	TLYLASQVK <b>S</b> SR TLYLASQVK <b>S</b> SR TLYLASQVK <b>S</b> SR TLYLASQVK <b>S</b> SR	T201 Y203 S210 S211	+	-
SRIM_021640	FadR family transcriptional regulator	QGEG <b>T</b> FFVVSQADPGDIMR	T72	+	-
SRIM_024090	transcriptional repressor	SAAAAPDDGPGAAGGASGAG <b>S</b>	S160	+	-
SRIM_024360	CarD family transcriptional regulator	AEALLDEVLA <b>S</b>	S160	+	-
SRIM_026145	MarR family transcriptional regulator	FNASLSTVTATLPAV <b>P</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>S</b>	T165	+	-
SRIM_029730	Lrp/AsnC family transcriptional regulator	T <b>T</b> ESFVY <b>L</b> K T <b>T</b> ESFVY <b>L</b> K	S141 T138	+	-
SRIM_039930	TetR/AcrR family transcriptional regulator	TSSA <b>S</b> G <b>T</b> I <b>H</b> P <b>R</b>	S6	+	-
SRIM_002915	DeoR/GlpR transcriptional regulator	FGA <b>S</b> SFCRFAAVR FGA <b>S</b> SFCRFAAVR	S215 S216	-	+
SRIM_008440	TetR family transcriptional regulator	MPTAPRPTAPAT <b>T</b> APPPSAAPSLTERR MPTAPRPTAPATAPPPSAAP <b>S</b> LTERR MPTAPRPTAPATAPPPSAAPSL <b>T</b> ERR	T12 S21 T23	-	+
SRIM_015875	WhiB family transcriptional regulator	M <b>T</b> ELFQELLVEEADEELGWQER	T2	-	+
SRIM_016835	LacI family transcriptional regulator	SVSTDYSDEQGAE <b>T</b> <b>R</b> <b>R</b>	T258	-	+
SRIM_016965	MerR family transcriptional regulator	ALGR <b>T</b> GPTADR ALGR <b>T</b> GPT <b>T</b> ADR	T132 T135	-	+

SRIM_021225	PadR family transcriptional regulator	DTSGD <b>T</b> GGLPR	T205	-	+
SRIM_021910	helix-turn-helix transcriptional regulator	RGLGDHLSIGERIA <b>F</b> YR	Y17	-	+
SRIM_022080	response regulator transcription factor	YEGWDIRAEGDG <b>T</b> AALRAAR	T41	-	+
SRIM_029080	PucR family transcriptional regulator	ELAGLPT <b>T</b> WHEALAAAR ELAGLPT <b>T</b> WHEALAAAR	T325 T326	- -	+ +
SRIM_029310	family transcriptional regulator NdgR	LSGLRD <b>T</b> VPVGSTLPMK LSGLRD <b>T</b> VPVG <b>S</b> TLPMK LSGLRD <b>T</b> VPVG <b>S</b> <b>T</b> LPMK	T124 S129 T130	- - -	+ + +
SRIM_031565	winged helix-turn-helix transcriptional regulator	SAV <b>S</b> SIERMPRVTAR SAV <b>S</b> SIERMPRVTAR	S119 S120	- -	+ +
SRIM_031755	DeoR/GlpR transcriptional regulator	TSEMTIRRDLE <b>L</b> ESR TSEMTIRRDLE <b>L</b> ESR	S45 T35	- -	+ +
SRIM_034420	MarR family transcriptional regulator	<b>V</b> SHLSLTDAGR	S110	-	+
<b>SRIM_038060</b>	response regulator transcription factor	LT <b>I</b> TEATVK	T175	-	+
SRIM_038590	helix-turn-helix transcriptional regulator	<b>I</b> SFALDVEDLADTR	S3	-	+
SRIM_039315	TetR/AcrR family transcriptional regulator	GVPI <b>S</b> TAR	S142	-	+
SRIM_021055	DNA-binding protein	TAGGSVLN <b>N</b> T <b>A</b> QTATSTGATTVR MDAAQ <b>Q</b> E <b>A</b> TARARELQR TAGGSVLN <b>N</b> T <b>A</b> QTATSTGATTVR TAGGSVLN <b>N</b> T <b>A</b> QTAT <b>S</b> TGATTVR TAGGSVLN <b>N</b> T <b>A</b> QTAT <b>S</b> <b>T</b> GATTVR TAGGS <b>V</b> LN <b>N</b> T <b>A</b> QTATSTGATTVR TAGGSVLN <b>N</b> T <b>A</b> QTATSTG <b>A</b> <b>T</b> TVR TAGGSVLN <b>N</b> T <b>A</b> QTAT <b>S</b> TGATTVR	T112 T9 T115 S118 T119 S107 T122 S117	+ + - - - - - -	+ - + + + + + +
SRIM_014225	VWA domain-containing protein	AVQLASAS <b>N</b> ED <b>T</b> AK VVDVVDAAT <b>T</b> GTVR VVDVVDAAT <b>T</b> GTVR	T416 T431 T433	+ + +	+ + -

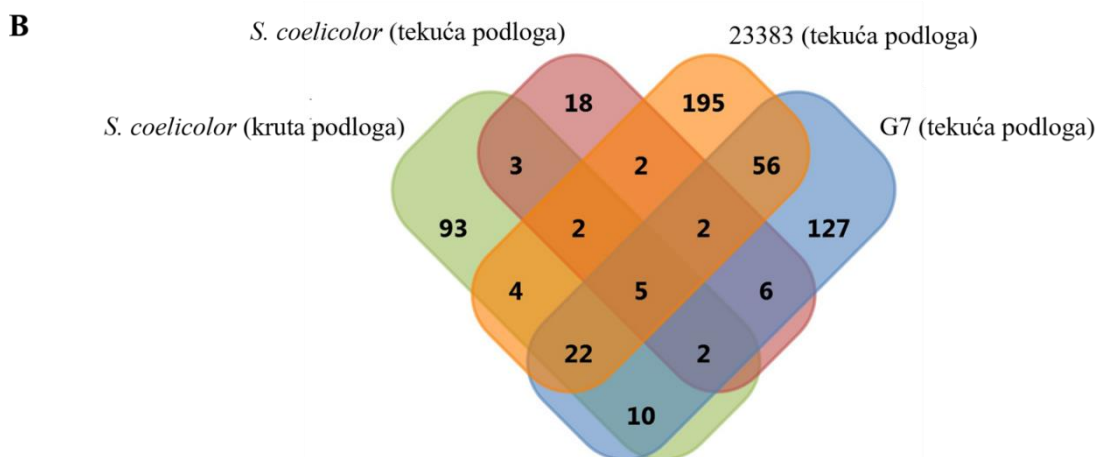
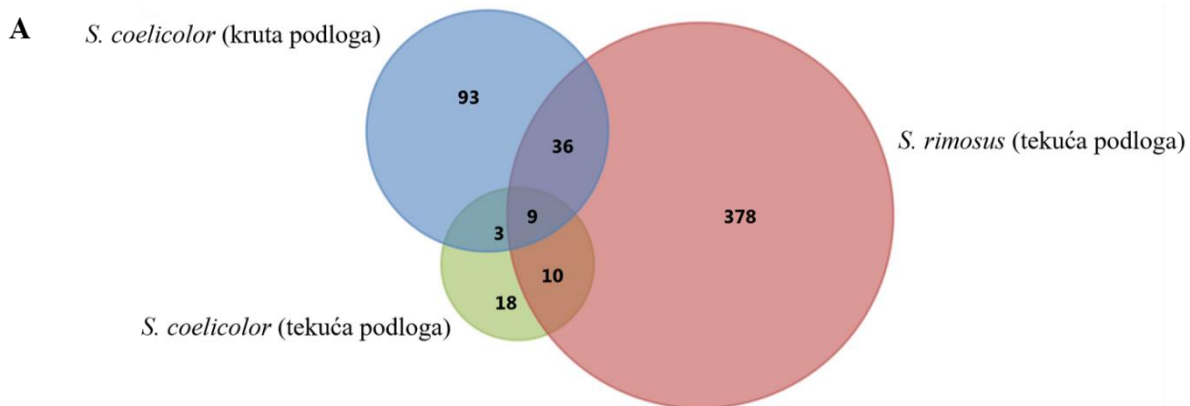


#### 4.4.6. Proteini nepoznate funkcije

Pregled proteina nepoznate funkcije i pridruženih im mjesta fosforilacije dan je u Tablici P 8. U ovu kategoriju svrstani su hipotetski proteini i proteini čija funkcija nije razjašnjena. U oba soja je pronađeno 13 proteina nepoznate funkcije u oba soja, dok je samo u soju G7 pronađeno 32 proteina. Značajan broj proteina nepoznate funkcije pronađen je u soju 23383 (65).

#### 4.5. Usporedba fosfoproteoma bakterija *S. rimosus* i *S. coelicolor*

Za dobivanje cjelovitog uvida u fosfoproteome dosad istraženih streptomiceta, napravljena je komparativna analiza svih objavljenih podataka modelnog organizma bakterije *S. coelicolor*<sup>24,25,26</sup> i rezultata dobivenih u ovoj studiji na dva soja bakterije *S. rimosus*. Od ukupno 170 identificiranih fosfoproteina kod *S. coelicolor* (Slika 33A) i 433 kod *S. rimosus*, samo 55 proteina je pronađeno u obje vrste, čime su ovi rezultati značajno povećali broj identificiranih fosfoproteina kod streptomiceta (fosfoproteom streptomiceta). Odmah se uočava kako je od ukupnog broja proteina iz bakterije *S. coelicolor* uzgajane u tekućoj podlozi (40), skoro 50% pronađeno i kod bakterije *S. rimosus*. Međutim, ovaj broj se znatno smanjuje (30%) kad se uspoređuje fosfoproteom bakterije *S. coelicolor* iz tekuće i krute podloge (Slika 33A). Slično ovom rezultatu, samo 32% istih fosforiliranih proteina je pronađeno kod bakterije *S. rimosus* iz tekuće podloge i bakterije *S. coelicolor* uzgajane na krutoj podlozi. Slika 33B prikazuje detaljno brojeve identificiranih fosforiliranih proteina kod različitim sojeva bakterije *S. rimosus*. Na dijagramu se također vidi broj sačuvanih proteina oba soja u odnosu na fosfoproteom bakterije *S. coelicolor*.



**Slika 33.** Usporedba fosfoproteoma bakterija *S. coelicolor* i *S. rimosus*. (A) Usporedba fosfoproteoma bakterije *S. coelicolor* identificiranog iz krute<sup>25,26</sup> i tekuće podloge<sup>24</sup> i ukupnog fosfoproteoma bakterije *S. rimosus* iz tekuće podloge. (B) Usporedba fosfoproteoma bakterije *S. coelicolor* identificiranog iz krute i tekuće podloge i fosfoproteoma sojeva *S. rimosus* 23383 i G7 iz tekuće podloge.

Osim toga, pretraživanjem baze dbPSP pronađeni su ortolozi fosforiliranih proteina *S. rimosus* i kod ostalih prokariota. Od ukupnog broja fosforiliranih proteina identificiranih u ovom radu, 293 proteina su prethodno identificirana u raznim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama i arhejama, dok 140 proteina nema svoje ortologe (Tablica P 9). Više od polovice tih proteina čine proteini nepoznatih funkcija (86), dok su ostali proteini podjednako raspoređeni u tri funkcionalne kategorije kao što se vidi u Tablici P 9. Kategoriji "Pohrana i procesiranje informacija" pripada 21 protein, 18 proteina pripada kategoriji "Metabolizam", a 15 proteina je iz kategorije "Stanični procesi i signalizacija". Većina ovih proteina je fosforilirana samo u soju 23383 (85), dok je u oba soja fosforilirano samo 17 proteina.

## 5. DISKUSIJA

Streptomiceti su industrijski izuzetno značajne bakterije, najpoznatije po proizvodnji antibiotika širokog spektra i drugih korisnih metabolita i zato se intenzivno koriste u industriji za proizvodnju lijekova preko 70 godina. Većina industrijskih sojeva je kroz cijeli niz godina bila izložena kemijskim ili fizičkim mutagenima što je dovelo do promjena genoma nakupljanjem nasumičnih mutacija, a ciljanom selekcijom su se odabirali sojevi s boljim prinosima željenog produkta. Unatoč značajnom komercijalnom doprinosu streptomicetnih bakterija farmaceutskoj industriji, promjene na razini proteoma ili regulacijskih mehanizama kod industrijskih sojeva su uglavnom ostale nerazjašnjene. Zasada većina visokoprotoknih („omics“) analiza što se tiče streptomiceta provedena je samo na modelnom organizmu, *S. coelicolor*, koji nije od komercijalnog značaja.

S obzirom da je bakterija *S. rimosus* industrijski izuzetno važna, zbog globalne upotrebe tetraciklina u izuzetno velikim količinama, fokus ovih istraživanja je bio usmjeren na rasvjetljavanje dinamike sinteze proteina i fosforilacije tijekom produženog bakterijskog rasta u tekućoj kulturi. Naime, poznato da je fosforilacija proteina jedan od ključnih regulatornih mehanizama koji kontrolira staničnu diferencijaciju i proizvodnju antibiotika i neke druge izuzetno važne stanične procese i zato se ova istraživanja u zadnje vrijeme provode intenzivno.

### 5.1. Profili (fosfo)proteoma analizirani su u specifičnim i strogo kontroliranim fazama rasta

Kao što se vidi u poglavlju Rezultati (4.1.3.), ispitani sojevi su pokazali različiti potencijal za biosintezu OTC-a (Slika 15, Tablica 12), ali i razlike u krivuljama rasta (Slika 14). Interesantno je za spomenuti da su dva soja koja bi trebala imati slične fenotipske karakteristike (divlji sojevi G7 i R7) neočekivano pokazali velike razlike u biosintezi OTC-a. Povećana proizvodnja OTC-a (80,23 ug/ml) u soju R7 može se pripisati spontanim mutacijama nastalim tijekom dugogodišnjeg precijepljivanja soja u laboratorijskim uvjetima. Zato je kao referentni soj u ovim istraživanjima odabran soj G7, a za usporedne analize (fosfo)proteoma odabran je *S. rimosus* 23383 jer je proizvodio najviše OTC-a (Tablica 12).

Detaljna analiza prinosa biomase ovih sojeva u velikom mjerilu pokazala je da oba soja tijekom rane eksponencijalne faze zaustavljaju svoj rast kroz kraći vremenski period (2-3h) u kojem je detektirana manja količina OTC-a (Slika 18 i 20). Ovaj fenomen prolaznog zaustavljanja rasta tijekom kojeg dolazi i do aktivacije biosinteze antibiotika, prvi put je uočen u bakteriji

*Streptomyces hygroscopicus*<sup>114</sup>, a zatim i kod bakterije *Streptomyces pristinaespiralis*<sup>115</sup>, gdje je detektirana i aktivacija gena za rezistenciju na antibiotik, dok je kod bakterije *S. coelicolor* tijekom zaustavljanja rasta uočeno smanjenje ribosomskih proteina<sup>116</sup> i povećanje proteina<sup>117</sup> koji odgovaraju na stanični stres. Neumann i suradnici su isto uočili ovaj zastoj u rastu kod bakterije *Streptomyces griseus* i nazvali su tu fazu "decision phase" zbog zapažene aktivacije sinteze antibiotika, sugerirajući da je ovaj fenomen vjerojatno opće svojstvo streptomiceta<sup>118</sup>. Prve rezultate analize proteoma iz ove faze rasta bakterije *S. coelicolor* objavili su Manteca i suradnici, pri čemu su također uočili da tijekom faze zastoja dolazi do diferencijacije micelija koja korelira s početkom proizvodnje antibiotika<sup>119,120</sup>.

Interesantno je da unatoč tome što je bakterija *S. rimosus* proučavana tijekom nekoliko desetljeća u različitim znanstvenim centrima, prema dosadašnjim spoznajama ovaj fenomen dosada nije opisan. Budući da je cilj ovog rada bio dobiti bolji uvid u događaje fosforilacije koji bi mogli biti ključni za proizvodnju OTC-a, ovo opažanje odredilo je izbor prve točke rasta za prikupljanje bakterijske biomase. Druga (SII) i treća (SIII) točka su odabrane zato što bakterija u SII zaustavlja svoj rast i ulazi u stacionarnu fazu zbog iscrpljivanja nutrijenata, dok je u u kasnoj fazi rasta bakterija izložena najvećoj koncentraciji antibiotika u mediju, i stoga je bila očekivana povećana sinteza proteina koji odgovaraju na stres.

S obzirom da soj 23383 proizvodi visoke koncentracije antibiotika i smeđeg pigmenta koji se intenzivno počinje nakupljati nakon faze SI (Slika 19), uz navedene točke za ovaj soj odabrana je i faza prije zaustavljanja rasta (S0; Slika 20). Naime, uočeni pigment je interferirao s analizom spektrometrije masa, zbog čega je promijenjen pristup pripreme uzoraka ovog soja i zato je uvedena dodatna točka za prikupljanje biomase, o čemu će se detaljnije diskutirati u tekstu koji slijedi. Također, uočene fenotipske promjene sugerirale su da bi se mogle uočiti i neke značajnije razlike na razini (fosfo)proteoma između ovih dviju točaka.

## **5.2. Uočene specifičnosti (fosfo)proteoma sojeva G7 i 23383**

Kao što je prikazano u rezultatima (4.2.1.), ukupna pokrivenost proteoma soja G7 je bila značajno (približno 50%), u skladu s dostupnim literaturnim podacima za druge bakterije<sup>14,25</sup>. Identifikacija proteoma je napravljena samo u dva biološka replikata jer su se MS mjerenja uzoraka soja G7 pokazala vrlo zahtjevnim zbog interferencije nekih sekundarnih metabolita koji su se počeli pojavljivati tijekom SII/SIII faze. Stoga je napravljena kvantitativna usporedba različitih faza rasta pomoću označavanja stabilnim izotopima, što je omogućilo preciznu relativnu kvantifikaciju, a smanjilo je broj vrijednosti koje nedostaju u skupu podataka.

Također, dva replikata korištena za ovu MS analizu se rutinski koriste i kod drugih bakterija u slučajevima kada višestruko ponavljanje nije izvedivo<sup>121,122</sup>. Uz navedeno, dva replikata su pokazala statistički dobru korelaciju u svim ispitivanim fazama rasta, a dobiveni rezultati nisu negirali uočene značajne promjene sinteze proteina i razine fosforilacije<sup>123</sup>. Analiza fosfoproteoma pokazala je značajno veći broj fosforiliranih proteina, uspoređujući dobivene rezultate s velikom većinom fosfoproteoma objavljenih u recentnom preglednom radu<sup>14</sup>. Uz to, treba istaknuti kako je raspodjela fosforiliranih aminokiselinskih ostataka u skladu s rezultatima dobivenim za modelni organizam ovog roda<sup>25</sup>. U većini drugih bakterija, prevladava fosforilacija na aminokiselinskim ostacima serina, dok je fosforilacija aminokiselinskih ostataka tirozina prema sadašnjim rezultatima najmanje zastupljena u svim bakterijama<sup>14</sup>. Uočena razlika u fosforilacijama aminokiselinskih ostataka serina i treonina mogla bi se objasniti većom zastupljenošću kodona za treonin u genomu bakterije *S. rimosus*

Također, na razini fosfoproteoma korelacije između replikata su nešto niže u odnosu na korelacije replikata za proteom, ali to se može pripisati činjenici da je udio fosforiliranih proteina u odnosu na cjelokupni proteom puno niži (230/3725), te da nisu sve eksprimirane molekule istog proteina fosforilirane u danom trenutku. Uz navedeno, treba uzeti u obzir i razinu osjetljivosti dostupnih metoda, kao i činjenicu da je fosforilacija i defosforilacija proteina izuzetno brz i dinamičan proces koji sigurno interferira s kvalitetom pripreme uzoraka. Osim toga, proteine je moguće identificirati pomoću više peptida, dok su fosforilirani proteini uglavnom ograničeni na identifikaciju preko jednog ili više mjesta fosforilacije jednog peptida. Za razliku od soja G7, zbog dodatnih analitičkih problema uočenih tijekom uzgoja soja 23383, izazvanih nakupljanjem velikih količina smeđeg pigmenta, uveden je dodatan korak za pročišćavanje proteina. Naime, preliminarni eksperimenti na MS-u su pokazali da uočeni pigment zaostaje na analitičkoj koloni koja je u sprezi sa spektrometrom masa što je uzrokovalo velike komplikacije tijekom izvođenja eksperimenata. Stoga su uzorci proteina izolirani iz ovog soja dodatno pročišćavani pomoću grafita<sup>124</sup>. Ovim pristupom značajno je smanjen udio pigmenta u uzorcima, no došlo je i do određenih gubitaka, što se odrazilo na identifikaciju ukupnog broja proteina. Unatoč činjenici da je za ovaj soj napravljen znatno veći broj eksperimenata (broj MS mjerenja: 72/23383; 27/G7), pokrivenost proteoma bila je svega oko 35% (podpoglavlje 4.2.3.). Iako je primjena grafita omogućila MS mjerenja ovog soja, dobiveni rezultati sugeriraju kako bi se ili trebala optimirati metoda za eluciju peptida zaostalih na grafitu, moguće primjenom nekih drugih organskih otapala, ili bi se trebala pronaći neka druga metoda za uklanjanje pigmenta iz uzoraka. Interesantno, bez obzira na uočene gubitke na razini proteoma, ove analize su rezultirale ukupno većim brojem identificiranih fosfoproteina

(288/2875). Ovo bi se moglo pripisati različitim afinitetima vezanja hidrofilnih i nehidrofilnih peptida prisutnih u uzorku<sup>124</sup>. Naime, za razliku od kolone C18 reverzne faze koja se koristi za pročišćavanje peptida prije mjerenja na MS-u, grafit ima sposobnost snažnog vezanja hidrofilnih molekula. S obzirom da su fosfopeptidi uglavnom mali i hidrofilni zbog dodatka hidrofilne fosfatne skupine, upotreba grafita je omogućila bolje vezanje fosfopeptida što je rezultiralo većim brojem ukupno identificiranih fosfopeptida u soju 23383. Što se tiče distribucije mjesta fosforilacije, potvrđen je trend opisan za G7 ( $T > S > Y$ ).

### **5.3. Dinamika sinteze i fosforilacije proteina kod sojeva G7 i 23383**

#### **5.3.1. Soj G7**

Analiza dinamike sinteze proteina detektirala je da ~50% identificiranih proteina pokazuje fluktuacije u ekspresiji proteina u različitim fazama rasta u oba biološka replikata. Među ovim proteinima, 28% je pokazalo statistički značajne razlike (Slika 21). Ovi proteini su podvrgnuti hijerarhijskom grupiranju kako bi se identificirali proteini sa sličnim vremenskim profilima tijekom rasta te da bi se dobio bolji uvid u funkcionalne kategorije koje su najrelevantnije za specifičnu fazu rasta (izlistani u Tablici P 1). Većina proteina pokazala je dva suprotna trenda, od kojih jedan pokazuje povećanje ekspresije proteina tijekom eksponencijalne faze (SI ili SI/SII) i naglo pada prema stacionarnoj fazi, dok druga grupa pokazuje značajno povećanje ekspresije u kasnoj fazi bakterijskog rasta (Slika 22). Ostali klasteri su zastupljeni s puno manjim brojem proteina, ali pokazuju veću fluktuaciju u svojoj ekspresiji tijekom rasta i kao takvi bi mogli biti zanimljivi za neke stanične procese koji su karakteristični u točno određenoj fazi rasta.

S obzirom na brojnost pronađenih proteina, diskutirat će se proteini koji prema svojim funkcijama najvjerojatnije značajno doprinose opisanim fiziološkim stanjima bakterija u ispitivanim fazama rasta.

Na primjer, u fazi zastoja (SI) koja se događa za vrijeme eksponencijalnog rasta identificirana su dva proteina (NrdA i NrdB) uključena u sintezu DNA<sup>125</sup>. Njihovo prisustvo ne iznenađuje s obzirom da bakterije nisu imale dugotrajni zastoje u rastu i nakon 2-3h nastavile su rasti eksponencijalno kada dolazi do ponovne intenzivne sinteze DNA<sup>116</sup>.

Osim toga, treba napomenuti i novije rezultate analize micelija tijekom bakterijskog rasta pomoću konfokalne mikroskopije koje je napravila suradnica u grupi (rad u postupku objave) koji pokazuju da se u ovoj fazi nalazi mješovita populacija micelija sa živim i mrtvim hifama.

U prilog ovoj diskusiji, također treba istaknuti identificirane proteine koji su povezani sa stresom, kao što su HflX, GTP-aza povezana s ribosomom i CarD, protein iz porodice transkripcijskih regulatora (Slika 21). Naime, poznato je da je HflX uključen u bakterijski odgovor na stres (engl. *stringent response*) jer sprječava biogenezu ribosoma<sup>126</sup>. Uz to, protein CarD se također javlja u odgovoru na različite stresove, npr. kod bakterije *Mycobacterium tuberculosis* je detektirana povećana sinteza ovog proteina tijekom stresa (~3-20 puta)<sup>127</sup>. Stoga se može pretpostaviti da proteini sa značajno povećanom ekspresijom koji sudjeluju u staničnom odgovoru na stres u SI fazi najvjerojatnije odražavaju regulatorne mehanizme koji kratkotrajno zaustavljaju rast bakterija u ovoj fazi.

Unatoč manjem broju proteina identificiranih u klasteru C čija je ekspresija značajno povećana u SII fazi, treba istaknuti da je ovaj klaster značajno obogaćen proteinima povezanim sa sekundarnim metabolitima i lipidima, što je u skladu s rezultatima prijavljenim za *S. coelicolor*<sup>26</sup>. Od 29 značajno promijenjenih proteina koji pripadaju sekundarnom metabolizmu, 11 ih je imalo značajno povećanu ekspresiju u ovoj fazi tijekom koje dolazi do izraženijeg nakupljanja antibiotika. Zato nije neočekivano da se ekspresija proteina koji sudjeluju u sintezi sekundarnih metabolita kontinuirano povećava prema SIII fazi, što se vidi i na primjeru 15 proteina iz klastera D/E, a pripadaju ovoj funkcionalnoj kategoriji (Slika 21). To pokazuje da su njihove aktivnosti intenzivnije tijekom kasnijih faza rasta što je u skladu s povećanjem antibiotika u fermentacijskom mediju.

Osim toga, treba napomenuti i proteine kodirane genima iz klastera za proizvodnju OTC-a. U ovim istraživanjima, detektirano je 13 od 25 proteina iz klastera za OTC koji nisu svrstani u ove klustere proteina sa sličnim vremenskim profilima jer nisu identificirani kao statistički značajno promijenjeni t-testom. Međutim, detaljna analiza promjene ekspresije ovih proteina pokazuje da je 8/13 proteina iz klastera za OTC kvantificirano te da im je ekspresija povećana više od 3 puta u fazi SIII, što korelira s količinom akumuliranog OTC-a u ovoj fazi rasta.

Rezultati pokazuju da većina proteina sa značajno povećanom ekspresijom u fazi SIII iz klastera D sudjeluje u odgovoru na stres, što je u skladu s fiziološkim stanjem bakterije u kasnoj stacionarnoj fazi (npr. DnaJ, MtrA, MprA) i očito je da ti proteini pomažu bakteriji preživljavanje u stresnim uvjetima (nedostatak hrane, povećane koncentracije antibiotika). Ostali značajno obogaćeni proteini iz faze SIII koji su svrstani u klaster E su proteini nepoznate funkcije i proteini koji sudjeluju u različitim procesima primarnog metabolizma (npr. proizvodnja i pretvorba energije, metabolizam aminokiselina i ugljikohidrata). Rioseras i suradnici<sup>26</sup> pokazali su sličan trend za *S. coelicolor* sugerirajući da povećana razina ovih



proteina doprinosi energiji i prekursorima potrebnim za sekundarni metabolizam u kasnijim fazama rasta streptomiceta. Očekivano, u ovoj fazi su jako zastupljeni proteini povezani s proteasomom (npr. ARC, PrcA, PrcB), koji su najvjerojatnije potrebni u većim količinama za održavanje minimalne sinteze proteina potrebne za preživljavanje bakterija u uvjetima stresa karakterističnim za ovu fazu<sup>128</sup>. Tome najvjerojatnije doprinose i proteini povezani s metabolizmom glutationa koji su također prevalentno zastupljeni u ovoj fazi, s obzirom da se zna da glutation bakterijama služi za zaštitu stanica od oksidativnog i osmotskog stresa<sup>129</sup>. U fazi SIII je također značajno povećanu ekspresiju imao i transkripcijski regulator iz obitelji TetR (SRIM\_040805), što nije iznenađujuće budući da je poznato da ovi proteini kontroliraju ekspresiju proteina koji kodiraju pumpu za efluks tetraciklina<sup>102</sup>. S druge strane, četiri ribosomska proteina uključena u translaciju imala su značajno smanjenu ekspresiju u SIII (RpmI, RpmA, RplD i RpsK), što je također u skladu sa stacionarnom fazom rasta i već je zabilježeno za druge bakterije, kao što su *E. coli* i *S. coelicolor*<sup>13026</sup>. Smanjivanje ekspresije ribosomskih proteina u kasnoj stacionarnoj fazi vjerojatno služi kao mehanizam kojim se usporava translacija proteina kako bi se sačuvala energija potrebna za preživljavanje bakterije u uvjetima staničnog stresa i nedostatka hrane.

Uz dinamiku sinteze proteina, detaljno je analizirana i dinamika fosforilacije. Iako je ukupno ~50% mjesta fosforilacije kvantificirano, taj broj je znatno manji ako se u obzir uzmu oba replikata, što je bilo premalo proteina da bi se dobio globalni uvid u diferencijalno regulirana mjesta fosforilacije na temelju funkcija statističkom analizom. Stoga, za ovu analizu je uzet arbitrarni prag (engl. *arbitrary cut-off*) od 1,5 na log<sub>2</sub> skali, što odgovara promjeni ekspresije od 3 puta, kao što je primijenjeno i u nekim drugim radovima<sup>26</sup>. Kao i za proteom, fokus istraživanja je bio usmjeren na to da se dobije uvid u globalne trendove fosforilacije na proteinima iz specifičnih funkcionalnih kategorija tijekom različitih faza rasta bakterije. Najviše proteina s povećanom fosforilacijom u SIII fazi pripada kategoriji "Primarni metabolizam" (Slika 24), što bi moglo ukazati na to da se većina ovih proteina fosforilacijom inhibira. Suprotno tome, povećana fosforilacija proteina koji sudjeluju u staničnom odgovoru na stres sugerira da se većina identificiranih proteina najvjerojatnije aktivira fosforilacijom. Najznačajnije promjene u dinamici fosforilacije su uočene na proteinima nepoznate funkcije, na kojima su razine fosforilacije povećane do 120 puta (npr. protein SRIM\_019790, Slika 24), što ukazuje na važnost detaljnijeg istraživanja njihovih bioloških uloga.

Detaljnou analizom pojedinih funkcionalnih kategorija ističu se neki interesantni fosforilirani proteini po fazama rasta. Npr. protein detektiran u fazi SI koji najvjerojatnije ima značajnu ulogu u zaustavljanju rasta je RsfS, dobro poznati faktor utišavanja sinteze proteina<sup>131</sup>. Također je interesantan i transkripcijski regulator (SRIM\_021055) koji pripada porodici proteina za ksenobiotski odgovor. Objavljeno je da jedan član ove obitelji kontrolira proizvodnju i razvoj antibiotika kod *S.coelicolor*<sup>132</sup>, pa je moguće da ima sličnu ulogu i kod bakterije *S. rimosus*. Također, treba istaknuti i proteine s povećanom razinom fosforilacije u ovoj fazi koji isto pripadaju kategoriji "Sekundarni metabolizam" (SRIM\_040820 i SRIM\_040830). Zanimljivo je da ovi proteini nemaju ortologe u bakteriji *S. coelicolor*, pa bi mogli imati značajnu ulogu u biosintezi sekundarnih metabolita koji su specifični za bakteriju *S. rimosus*.

Prevalencija povećane fosforilacije regulatornih proteina u fazi SII (Slika 24) odražava važnost signalnih mreža za prilagodbu bakterija na iscrpljivanje hranjivih tvari, koja koristi fosforilaciju za regulaciju staničnih procesa tijekom tranzicijske faze. Osim toga, identifikacija povećane fosforilacije manjeg broja proteina iz kategorija "Stanični ciklus i dioba", "Primarni metabolizam" i "Stanični odgovor na stres" sugerira specifične proteine čije biološke uloge bi mogle biti regulirane ovom PTM i pokazuje dinamiku ovih promjena. U ovoj grupi proteina posebno se ističe jedna dTMP kinaza (SRIM\_023100, Slika 24) koja je ključna za replikaciju i popravak DNA s čak tri povećana mjesta fosforilacije. Naime, to je u skladu s nedavno dobivenim rezultatima konfokalne mikroskopije naše grupe gdje su uočena fragmentacija micelija i stanična smrt bile najjače izražene tijekom SII faze (rad u postupku objave), što ukazuje kako fosforilacija pozitivno aktivira ovaj protein u fazi rasta tijekom koje dolazi do značajnog oštećenja DNA.

Povećana fosforilacija proteina identificirana u kasnoj fazi rasta (SIII; Slika 24) vjerojatno sudjeluje u regulatornim procesima koji mijenjaju aktivnosti specifičnih proteina, kako bi se bakterija brzo prilagodila stresu i gladovanju. Npr. tri ribosomska proteina s povećanim razinama fosforilacije (30S ribosomalni proteini S16, SRIM\_029570 i S17, SRIM\_018535 i 50S ribosomalni protein L31, SRIM\_028075) identificirana su u SIII fazi. Ovi rezultati su u skladu s povećanjem fosforilacije ribosomskih proteina i kod udaljenih bakterijskih vrsta<sup>14</sup>, što sugerira da ova PTM pomaže u utišavanju sinteze proteina i kod streptomiceta<sup>133</sup>. Uzimajući u obzir i već opisane rezultate dinamike sinteze ribosomskih proteina (Slika 21), kao i ovdje navedene rezultate može se zaključiti kako bakterija najvjerojatnije koristi dva mehanizma za

usporavanje translacije proteina, bilo (i) smanjenjem koncentracije ribosomskih proteina ili (ii) inhibicijom njihove funkcije putem fosforilacije.

Što se tiče proteina koji sudjeluju u odgovoru na stres, tijekom SIII faze detektirana je povećana fosforilacija proteina Dps (SRIM\_030245, Slika 24D-b) za kojeg je poznato da štiti bakterije tijekom perioda gladovanja, a također se zna da je induciran i oksidativnim stresom, kao i košaperon GroES (SRIM\_018295, Slika 24-b). Detekcija fosforilacije ovih porodica proteina u brojnim taksonomski udaljenim bakterijama sugerira da je ova posttranslacijska modifikacija evolucijski sačuvan mehanizam regulacije njihovih aktivnosti<sup>14134</sup>.

### 5.3.2. Soj 23383

Kvantitativna MS mjerenja proteinskih uzoraka soja 23383 su bila, kao što je već navedeno u diskusiji o kvalitativnoj analizi proteoma ovog soja, značajno kompliciranija, zbog povećane akumulacije smeđeg pigmenta, naročito u fazama SII i SIII bakterijskog rasta (Slika 19). S obzirom na mali broj kvantificiranih proteina, kao i činjenicu da je preklapanje identificiranih proteina bilo između 0,3-0,4 za omjere proteina između SII/SI i SIII/SII, u ovom radu je prikazana samo dinamika sinteze proteina između SIII i SI faza, gdje je korelacija između replikata bila oko 0,6 (Slika P 3). Ovim pristupom su prikazani proteinski profili iz specifičnih fizioloških stanja koji su i statistički najpouzdaniji. Iz grafičkog prikaza na Slici 28A, vide se jasni trendovi dinamike sinteze proteina koji pripadaju različitim funkcionalnim fazama tijekom rane i kasne faze bakterijskog rasta. Naime, iako u fazi SI dolazi do kratkotrajnog zastoja rasta, najbrojniji su proteini koji pripadaju kategoriji "Pohrana i procesiranje informacija" tj. podkategorijama "Translacija, izmjena proteina i šaperoni", "Replikacija, rekombinacija i popravak" i "Transkripcija", nakon čega slijede proteini koji su uključeni u primarni, ali i u sekundarni metabolizam. Ovo je u skladu s detekcijom proteina iz klastera za sintezu OTC-a, ali i drugih metabolita koji sudjeluju u sintezi sekundarnih metabolita. Također treba istaknuti da je od ukupno 25 proteina iz klastera za OTC u ovim analizama detektirano 22 proteina, dok je u G7 detektirano samo 13, što pokazuje da je u ovom soju došlo do povećane ekspresije proteina koji sudjeluju u biosintezi OTC-a, što sigurno ima direktan utjecaj na biosintezu antibiotika<sup>135</sup>. Također, nije neočekivano da se povećavaju proteini iz kategorije "Stanični procesi i signalizacija", s obzirom da se radi o strogo kontroliranoj i specifičnoj fazi rasta u kojoj je uspostavljena dinamička ravnoteža između stanične smrti i novonastalih peleta koji nakon zastoja nastavljaju eksponencijalni rast (rad u postupku objave). Tako se, kao i kod

soja G7, u ovoj fazi može uočiti povećana razina proteina koji imaju važne uloge u stresnim uvjetima, sugerirajući njihovu ulogu tijekom zastoja u rastu tijekom rane eksponencijalne faze (Tablica P 3A). Npr. neki od njih su transkripcijski regulatori CarD i LexA, koji se i kod drugih bakterija prekomjerno eksprimiraju prilikom stresa; protein RbpA, koji vezuje RNA polimerazu, za kojeg se zna da se prekomjerno eksprimira u *S. coelicolor* tijekom izlaganja antibiotiku pri čemu putem sigma faktora regulira sintezu rRNA; te dva "cold-shock" proteina. S druge strane, povećano je i nekoliko transkripcijskih regulatora koji reflektiraju fiziološko stanje u kojem se bakterija suočava s nedostatkom hrane i nakupljanjem antibiotika u kasnoj stacionarnoj fazi, što ukazuje na proteine koji djeluju na isti način, ali se aktiviraju tijekom različitih tipova stresa (Tablica P 3B). Tako je u fazi SIII povećana razina proteina TetR, transkripcijskog regulatora odgovornog za rezistenciju na antibiotik, i TraR/DksA, transkripcijskog regulatora koji tijekom nutritivnog stresa utječe na smanjenu sintezu rRNA i povećanu sintezu za biosintezu i transport određenih aminokiselina. Ostali proteini koji sudjeluju u transkripciji, kao i translaciji i replikaciji su značajno utišani u SIII (Slika 27A), dok se povećavaju proteini uključeni u staničnu signalizaciju, te proteini uključeni direktno u sekundarni metabolizam, ali i proteini primarnog metabolizma koji osiguravaju bakterijama proizvodnju dodatne energije i metabolita koji indirektno podupiru biosintezu sekundarnog metabolizma. Kao i kod G7, i kod soja 23383 se u SIII izrazito povećava ekspresija proteina nepoznatih funkcija, što ukazuje na njihovu izuzetnu važnost za preživljavanje i fiziologiju stanica i u kasnoj fazi rasta. U istraživanja proteoma visokog producenta je uvedena jedna dodatna točka iz rane eksponencijalne faze rasta, kako bi se dobio uvid u proteomske profile neposredno prije zaustavljanja rasta i početka biosinteze antibiotika i kako bi se izbjegli analitički problemi nastali nakupljanjem pigmenta. Očekivano, s obzirom da se radi o ranoj eksponencijalnoj fazi, najzastupljeniji u S0 su esencijalni proteini koji sudjeluju u rastu i diobi bakterijskih stanica, najviše ribosomski proteini, nakon čega slijede proteini uključeni u replikaciju DNA – (Slika 27B, Tablica P 4A). Uočljivo je i da su proteini metabolizma također imali izuzetno povećanu ekspresiju u S0, među kojima i proteini uključeni u biosintezu, transport i katabolizam sekundarnih metabolita, no treba istaknuti kako nijedan protein iz klastera za OTC nije identificiran, za razliku od faze SI. Ulaskom u fazu SI, kad je detektiran OTC u hranjivom mediju, identificirani su i proteini koji sudjeluju u njegovoj biosintezi, kao što je opisano u poglavlju iznad (Tablica P 4B). I ovi rezultati sugeriraju da bi proteini nepoznate funkcije mogli imati značajniju biološku ulogu ili u regulaciji zastoja ili u sintezi OTC-a, jer se njihova ekspresija kontinuirano povećava od detekcije OTC-a.

Kao što je navedeno, u soju 23383 ukupno je detektirano 288 fosfoproteina proteina, što je približno 20% više nego u soju G7. No, što se tiče dinamike ovih diferencijalno fosforiliranih proteina, uspješno je kvantificirano samo 98 proteina, iako je napravljen znatno veći broj mjerenja. Ovo se također pripisuje navedenim problemima koje su stvarali sekundarni metaboliti bakterija (smeđi pigment), budući da za velik broj fosfopeptida nije izmjeren intenzitet odgovarajućeg nefosforiliranog peptida pa nije bilo moguće napraviti normalizaciju i samim time kvantificirati mjesto fosforilacije. Stoga je u ovom soju promjena ekspresije proteina praćena primjenjujući niži arbitrarni prag (1 na  $\log_2$  skali), čime je dobiven uvid u promjenu fosforilacije proteina od 2 puta u različitim fazama rasta. Također su uzeti u obzir i rezultati MS mjerenja koji su dobiveni u S0 fazi, s obzirom da je u toj fazi količina detektiranog pigmenta bila neznatna. Sažetak rezultata ovih analiza prikazan je na Slici 28 i 29. Uočava se najmanji izmjereni broj proteina s povećanom fosforilacijom u S0. Vidljivo je da je detektirana jedna S/T kinaza s povećanom fosforilacijom, no ukupan rezultat sugerira nešto nižu aktivnost regulatornih mehanizama koji uključuju ovu PTM tijekom najranijih faza rasta bakterije.

Zanimljivo je to da je od ukupnog broja diferencijalno fosforiliranih proteina u SI, čak jedna trećina proteina koji sudjeluju u staničnom odgovoru na stres (Slika 27; SRIM\_023100, SRIM\_019725, SRIM\_040715, SRIM\_007640). Fosforilacija ovih proteina bi mogla imati važnu regulatornu ulogu u zaustavljanju rasta bakterije tijekom eksponencijalne faze. U ovoj fazi također je povećana fosforilacija na tri proteina koja sudjeluju u sekundarnom metabolizmu, od čega je jedan iz klastera za biosintezu OTC-a (OxyC). Prema dosadašnjim spoznajama, nema znanstvenih radova koji opisuju utjecaj fosforilacije na aktivnost proteina koji su direktno uključeni u biosintezu antibiotika, iako je prema bazi dbPSP fosforilacija ortologa tog proteina pronađena i kod *S. coelicolor* u 'omics' studiji<sup>17</sup>.

U fazama SII i SIII kod soja 23383, povećana fosforilacija se uočava najviše kod ribosomskih proteina (SRIM\_029980; SRIM\_018535, SRIM\_018615) i proteina nepoznatih funkcija. Posebno se ističe 30S ribosomski protein S17 (SRIM\_018535) kojemu se fosforilacija povećava 50 puta u SII i gotovo 500 puta u SIII u odnosu na SI, što je najviše među svim podacima o dinamici fosforilacije proteina koji su dobiveni za oba soja. Ovi rezultati dodatno sugeriraju da bakterija fosforilacijom ribosomskih proteina negativno regulira sintezu svojih proteina i time zaustavlja rast.

U sažetku, iako je diferencijalna fosforilacija dobivena na malom broju proteina, njihova analiza sugerira da fosforilacija proteina uključenih u stres, kao i onih iz sekundarnog

metabolizma u soju 23383 ima važnu ulogu u SI fazi, dok je fosforilacija proteina nepoznatih funkcija izraženija u fazama SII i SIII.

#### 5.4. Komparativna analiza

Iz dobivenih rezultata oba proteoma (Slika 30), uočava se da se oni preklapaju samo 63%. Ovaj rezultat može se pripisati najviše činjenici da je identifikacija proteoma soja 23383 bila manje učinkovita, što je već diskutirano (5.2.) kao i uočenim problemima tijekom analize izazvanim nakupljanjem pigmenta zbog čega je uveden dodatan korak tijekom pročišćavanja peptida (kolona s grafitom). Također, treba uzeti u obzir i da je identifikacija proteoma pomoću programa MaxQuant napravljena na temelju *in silico* predikcije proteoma soja G7. Naime, sekvenca genoma soja 23383 još uvijek nije dostupna. To bi moglo objasniti zašto oko 10% proteina nisu identificirani u proteomu soja G7. No, postoji mogućnost i da je dio ovih proteina utišan u divljem soju te da se samo prekomjerno eksprimiraju u soju 23383, čiji metabolizam je prilagođen za proizvodnju visokih koncentracija OTC-a (35x više nego u G7).

Značajnije razlike između ova dva soja su dobivena za njihove fosfoproteome. Kao što se vidi na Slici 30, od ukupnog broja identificiranih fosfoproteina u oba soja, samo 19,6% je zajedničko. Ovo je neočekivan i izuzetno interesantan rezultat jer bi se mogao pripisati razlikama u fiziologiji bakterije nastalim zbog uvedenih nasumičnih mutacija u 23383, pri čemu je kod soja koji proizvodi znatno više antibiotika došlo do promjene u regulaciji i prekomjerne ekspresije nekih važnih proteina (transkripcijskih faktora/regulatora) koji posredno ili neposredno putem signalnih kaskada kontroliraju proteine iz klastera za biosintezu OTC-a, za rezistenciju na antibiotik ili neke druge stanične mehanizme koji omogućavaju veću otpornost na odziv na stres.

Komparativna analiza distribucije proteina dvaju sojeva prema njihovim funkcionalnim kategorijama prema programu eggNOG (Slika 31), pokazuje da je najzastupljenija kategorija u oba soja "Metabolizam", što je bilo očekivano s obzirom da su ti proteini stalno potrebni za održavanje bazalnog metabolizma bakterije, ali i za sintezu sekundarnih metabolita, karakterističnih za ovu bakteriju<sup>26,25</sup>. Najinteresantnije razlike uočavaju se u kategoriji "Stanični procesi i signalizacija". Udjeli ove kategorije u proteomu i fosfoproteomu kod divljeg tipa se značajnije razlikuju, dok kod producenta dolazi do smanjenja ovog udjela u fosfoproteomu. S obzirom da je fosfoproteom soja 23383 nešto veći, ovaj rezultat bi se mogao pripisati nekim promjenama na razini regulatornih mehanizama. Suprotno, u kategoriji "Pohrana i procesiranje

informacija", koja sadrži također znatan broj regulatornih proteina, veći je udio fosforiliranih proteina kod visokog producenta OTC-a u odnosu na divlji tip.

Kod oba soja je posebno zanimljiva velika zastupljenost proteina nepoznatih funkcija i u proteomu i u fosfoproteomu, što je izraženo u gotovo u svim funkcionalnim analizama i na neki način ističe izuzetan značaj ovih proteina tijekom rasta ove bakterije. Zato bi detaljnija istraživanja bioloških uloga proteina s nepoznatom funkcijom mogla znatno pridonijeti boljem razumijevanju raznih staničnih procesa.

Napravljena je i detaljna funkcionalna kategorizacija i usporedba proteina unutar različitih kategorija. Važno je napomenuti da su u ovim analizama združeni proteini sličnih bioloških uloga, kako bi se smanjio broj podkategorija koje daje program eggNOG (20 – Slika 32) i tako dobio bolji uvid u globalne trendove. Na taj način je svoje rezultate analizirao i Manteca i sur.<sup>25</sup>. Tako je dobiveno samo 6 glavnih podkategorija iz kojih su za diskusiju izdvojeni najinteresantniji proteini koji bi mogli biti direktno povezani s povećanom biosintezom OTC-a, kao i povećanom razinom stresa, moguće zbog akumulacije velike količine antibiotika. Naime, najznačajnije razlike između sojeva se uočavaju u proteinima povezanim sa sekundarnim metabolizmom (5 u G7, 14 u 23383). Posebno se ističu proteini iz klastera za biosintezu OTC-a, gdje je od 25 proteina čak 4 fosforilirano u 23383, dok u G7 nije detektirana fosforilacija niti jednog od ovih proteina (Tablica 14). Buduća istraživanja s ciljanom mutagenozom mjesta fosforilacije tih proteina dat će odgovor na važnost ove fosforilacije za funkcionalnost i u konačnici za sintezu OTC-a. Prema dosadašnjim spoznajama nema objavljenih rezultata o utjecaju fosforilacije proteina koji sudjeluju u sintezi sekundarnih metabolita na prinos antibiotika što čini nastavak ovih istraživanja izuzetno atraktivnim.

Sličan trend se uočava i kod proteina koji su važni za odgovor na stanični stres. Naime, u Tablici 15 se vidi da je daleko više ovih proteina detektirano u soju 23383, što sugerira da je moguće da su odziv na stres i biosinteza antibiotika u regulatornoj korelaciji. Tome u prilog govori činjenica da sinteza antibiotika u stanici korelira s pojavom staničnog stresa<sup>119</sup>. Neki od ovih proteina su jedinstveno pronađeni u ovoj studiji, ali svaki od njih zahtijeva posebno istraživanje kako bi se rasvijetlila biološka uloga ove PTM na njihovu funkciju (Tablica 15).

Uz proteine povezane sa sekundarnim metabolizmom i odgovorom na stanični stres, sojevi G7 i 23383 pokazali su najveće razlike u fosforilaciji proteina nepoznate funkcije. Naime, čak 27% fosfoproteoma soja 23383 sačinjavaju proteini iz ove kategorije, dok je kod soja G7 to 19,5%,

što čini ukupno 25% cjelokupnog fosfoproteoma u oba soja. Ono što je posebno interesantno je da za čak 80% proteina nepoznate funkcije identificiranih u ovom radu, fosforilacija zabilježena prvi put, prema bazi podataka dbPSP.

Za kraj, važno je posebno istaknuti regulatorne proteine. U ovim istraživanjima pronađen je izuzetno velik broj transkripcijskih regulatora u oba soja, no također izuzetno veliki broj koji je pronađen kod soja 23383 koji bi mogli biti u direktnoj ili indirektnoj vezi i sa povećanom sintezom antibiotika. Unutar ove kategorije također su zanimljive kinaze, gdje je od ukupnog broja na genomu detektirano čak 56% kinaza (32). Skoro dvije trećine od ovih kinaza je bilo fosforilirano (13/18). Interesantno je da je veći broj fosforiliranih kinaza pronađen u soju G7. Među njima, posebno zanimljiv primjer je AfsK (SRIM\_017990), koja je jedna od najbolje proučenih STPK u bakteriji *S. coelicolor* i pronađena je fosforilirana u oba soja. Kao što je već opisano u uvodu, ovo je glavna kinaza koja kontrolira proizvodnju antibiotika fosforilacijom AfsR, aktivatora transkripcije<sup>105</sup>, a osim toga, AfsK regulira i polarni rast i grananje hifa<sup>41</sup> fosforilacijom proteina DivIVA i inicijaciju replikacije kromosoma fosforilacijom proteina DnaA u bakteriji *S. coelicolor*. U ovom radu, pronađeno je da je AfsK fosforilirana u svim fazama rasta tijekom kojih je bakterija kontinuirano sintetizirala OTC, što sugerira da ova kinaza također može igrati važnu ulogu u regulaciji sinteze OTC-a i zato ovaj protein predstavlja važan model za istraživanje regulacije OTC-a.

U usporedbi s modelnim organizmom *S. coelicolor*, pokrivenost identificiranih kinaza u ukupnom genomu bila je podjednaka (56-57%), međutim zanimljivo je da su samo 4 kinaze pronađene kao fosforilirane tj. aktivne u bakteriji *S. coelicolor*. Među njima, tri kinaze su pronađene u relativnom malom fosfoproteomu tijekom rasta bakterije u tekućem mediju (3/40), dok je samo jedna kinaza pronađena tijekom rasta na krutoj podlozi u velikom fosfoproteomu (1/127), što bi moglo sugerirati da njihove aktivnosti ovise o uvjetima rasta. Usporedbom ortologa kinaza *S. rimosus* sa *S. coelicolor* može se zaključiti da bi kinaze SRIM\_070050, SRIM\_017990 i SRIM\_020800 mogle biti aktivnije u tekućoj kulturi. Osim kinaza, uspoređen je broj svih fosforiliranih proteina identificiranih u bakterijama *S. coelicolor* i *S. rimosus*, kako bi se dobio uvid u fosfoproteome dosad istraženih streptomiceta. Od ukupno 550 proteina fosforiliranih u obje vrste bakterije, samo 10% je zajedničko, što znači da je ova studija znatno doprinijela povećanju dosadašnjeg fosfoproteoma kod streptomiceta. Ovi rezultati bi se mogli objasniti: (i) kultiviranjem bakterija (naime, fosfoproteom bakterije *S. rimosus* je dobiven iz tekuće culture); (ii) činjenicom da su analize na bakteriji *S. rimosus* provedene i na mutiranom



soju koji je neke fosfoproteine možda prekomjerno ekspimirao pa su bili lakše dostupni za detekciju; (iii) ili primjenom različite metodologije u pripremanju uzoraka za MS. Ono što je također zanimljivo za istaknuti je da je, slično kao što je već spomenuto i za kinaze, fosfoproteom *S. coelicolor* pronađen u tekućoj kulturi pokazao veću sličnost s fosfoproteomom *S. rimosus* koji je druga, evolucijski udaljena vrsta, nego s fosfoproteomom iste bakterije uzgajane na drukčijoj vrsti podloge podlozi. Ovo nije toliko neočekivano s obzirom da se zna da uvjeti rasta mogu utjecati na status fosforilacije.

Za kraj, kako bi se dobio bolji uvid u sačuvanost fosforilacije ortologa unutar različitih prokariotskih vrsta, svi fosforilirani proteini identificirani u ovom radu su uspoređeni s proteinima iz baze dbPSP. Ova analiza je pokazala kako čak 32% fosforiliranih proteina identificiranim u ovom radu nije do sada objavljeno niti za jednu drugu vrstu prokariota, pri čemu više od polovice ovih proteina čine proteini nepoznatih funkcija (Tablica P 9).

Jedan od razloga zašto čak jedna trećina fosforiliranih proteina iz ovog rada nije identificirana niti u jednom drugom prokariotskom organizmu može se pripisati činjenici da su baze fosforiliranih proteina u bakterijama još uvijek jako oskudne. S druge strane, dinamika fosforilacije tijekom specifičnih faza bakterijskog rasta ovih dosad nezabilježenih fosforiliranih proteina, posebice onih s nepoznatom funkcijom, mogla bi biti karakteristična za bakteriju *S. rimosus* (i/ili streptomicete/aktinobakterije općenito) te usmjeriti buduća istraživanja i pomoći u rasvjetljavanju njihove biološke uloge. Posebice bi zanimljivo bilo istražiti ih u soju 23383 koji proizvodi velike količine antibiotika, s obzirom da je duplo veći broj fosfoproteina iz ove funkcionalne skupine, u odnosu na divlji tip. Ovi proteini bi mogli biti važni za povećanu proizvodnju sekundarnih metabolita, karakterističnu za ovaj soj.

U sažetku, ovo je do sada jedinstvena studija istraživanja proteoma i fosfoproteoma dva soja iste vrste streptomiceta koji se razlikuju značajno po genetičkom potencijalu biosinteze antibiotika. Zato će dobiveni rezultati ovdje prikazanih analiza predstavljati izvor novih podataka koji će usmjeravati buduća istraživanja kompleksnih regulatornih mehanizama koji kontroliraju staničnu diferencijaciju i biosintezu antibiotika kod streptomiceta.

## 6. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata o proteomu i fosfoproteomu bakterije *S. rimosus*, sojeva G7 i 23383, može se zaključiti sljedeće:

1. Proizvodnja sekundarnih metabolita značajno je utjecala na identifikaciju proteina i fosfoproteina, što je vidljivo kod soja 23383 kod kojeg je sinteza smeđeg pigmenta tijekom rasta bakterije bila značajno izražena.
2. Primjena grafita za uklanjanje pigmenta iz proteinskih uzoraka uzrokovala je značajno smanjenje broja identificiranih proteina u proteomu (~25% manje), ali je omogućila izrazito povećanje broja identificiranih fosfoproteina (~25% više).
3. Ukupno je identificirano 45,6% proteoma divljeg soja G7 i 35,2% proteoma soja 23383, koji sintetizira približno 35 puta više OTC-a; od ukupnog broja identificiranih proteina 62,8% proteina je pronađeno u oba soja.
4. Ukupno je identificirano 230 fosforiliranih proteina kod soja G7 i 288 fosforiliranih proteina kod soja 23383; od ukupnog broja identificiranih fosfoproteina samo 19,6% je pronađeno u oba soja.
5. Različite faze rasta (SI, SII i SIII) su pokazale specifičnosti u dinamici sinteze i fosforilacije proteina koji pripadaju različitim funkcionalnim kategorijama, što odražava i specifična fiziološka stanja bakterija.
6. Kod soja G7 u fazi SI uočena je značajnija fosforilacija regulatornih proteina, a u fazi SIII proteina koji sudjeluju u odgovoru na stres, proteina iz primarnog metabolizma, kao i proteina nepoznatih funkcija.
7. Kod soja 23383 u fazi SI uočena je značajnija fosforilacija proteina koji sudjeluju u odgovoru na stres, a u fazi SIII proteina koji sudjeluju u primarnom metabolizmu, kao i proteina nepoznatih funkcija.
8. Usporedba fosfoproteoma sojeva G7 i 23383 identificirala je proteine koji sudjeluju u brojnim staničnim procesima, a pokazuju različite razine fosforilacije kod ova dva ispitana soja.
9. Fosfoproteom bakterije *S. rimosus* identificiran u ovoj studiji značajno je povećao ukupan broj dosad poznatih fosforiliranih proteina kod streptomiceta (378), kao i broj dosad identificiranih fosforiliranih proteina kod prokariota općenito (140).

## 7. LITERATURA

1. Chandra, G. & Chater, K. F. Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 345–379 (2014).
2. Barka, E. A. *et al.* Taxonomy, Physiology .... *Am. Soc. Microbiol.* **80**, 1–43 (2016).
3. Chater, K. F. Recent advances in understanding *Streptomyces* [version 1; referees: 4 approved]. *F1000Research* **5**, 1–16 (2016).
4. Hopwood, D. A. *Streptomyces in nature and medicine : the antibiotic makers*. (Oxford University Press, 2007).
5. Petković, H., Lukežič, T. & Šušković, J. Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*: Past, Present and Future Directions in the Development of Tetracycline Antibiotics. *Food Technol. Biotechnol.* **55**, 3–13 (2017).
6. Lee, N. *et al.* Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Sci. Data* **7**, 1–9 (2020).
7. Caicedo-Montoya, C., Manzo-Ruiz, M. & Ríos-Esteva, R. Pan-Genome of the Genus *Streptomyces* and Prioritization of Biosynthetic Gene Clusters With Potential to Produce Antibiotic Compounds. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
8. Bentley, S. D. *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces*. *Nature* **417**, 141–147 (2002).
9. Van Der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F. & Van Wezel, G. P. Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: New perspectives from the post-genomic era. *Nat. Prod. Rep.* **35**, 575–604 (2018).
10. Mijakovic, I. & Macek, B. Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 877–892 (2012).
11. Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M. & Santamaría, R. I. Two-component systems in *Streptomyces*: Key regulators of antibiotic complex pathways. *Microb. Cell Fact.* **12**, 1–10 (2013).
12. Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science (80-. )*. **241**, 42–52 (1988).
13. Cousin, C. *et al.* Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. *FEMS Microbiol. Lett.* **346**, 11–19 (2013).
14. Yagüe, P., Gonzalez-Quiñonez, N., Fernández-García, G., Alonso-Fernández, S. & Manteca, A. Goals and challenges in bacterial phosphoproteomics. *Int. J. Mol. Sci.* **20**,

- 1–14 (2019).
15. Nagarajan, S. N., Lenoir, C. & Grangeasse, C. Recent advances in bacterial signaling by serine/threonine protein kinases. *Trends Microbiol.* **30**, 553–566 (2022).
  16. Macek, B. & Mijakovic, I. Site-specific analysis of bacterial phosphoproteomes. *Proteomics* **11**, 3002–3011 (2011).
  17. Shi, Y. *et al.* dbPSP 2.0, an updated database of protein phosphorylation sites in prokaryotes. *Sci. Data* **7**, 1–9 (2020).
  18. Macek, B. *et al.* The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 697–707 (2007).
  19. Macek, B. *et al.* Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 299–307 (2008).
  20. Bonne K hler, J. *et al.* Importance of protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation for bacterial pathogenesis. *FEBS Lett.* **594**, 2339–2369 (2020).
  21. Bendt, A. K. *et al.* Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **3**, 1637–1646 (2003).
  22. Soufi, B. *et al.* The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Lactococcus lactis* IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. *Proteomics* **8**, 3486–3493 (2008).
  23. Licona-Cassani, C., Lim, S., Marcellin, E. & Nielsen, L. K. Temporal dynamics of the *saccharopolyspora erythraea* phosphoproteome. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1219–1230 (2014).
  24. Parker, J. L. *et al.* Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *Proteomics* **10**, 2486–2497 (2010).
  25. Manteca, A. & Ye, J. Phosphoproteome Analysis of *Streptomyces* Development Reveals Extensive Protein Phosphorylation Accompanying Bacterial Differentiation. 5481–5492 (2011).
  26. Rioseras, B. *et al.* Quantitative Proteome and Phosphoproteome Analyses of *Streptomyces coelicolor* Reveal Proteins and Phosphoproteins Modulating Differentiation and Secondary Metabolism . *Mol. Cell. Proteomics* **17**, 1591–1611 (2018).
  27. Maharjan, S., Oh, T. J., Lee, H. C. & Sohng, J. K. Heterologous expression of *metK1*-*sp* and *afsR*-*sp* in *Streptomyces venezuelae* for the production of pikromycin. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1621–1626 (2008).
  28. Lamichhane, J., Jha, A. K., Singh, B., Pandey, R. P. & Sohng, J. K. Heterologous

- production of spectinomycin in *Streptomyces venezuelae* by exploiting the dTDP-d-desosamine pathway. *J. Biotechnol.* **174**, 57–63 (2014).
29. Petković, H. *et al.* Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 704–28 (2006).
  30. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).
  31. Sversut, R. A. *et al.* A Critical Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Oxytetracycline in Biological and Pharmaceutical Matrices. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **47**, 154–171 (2017).
  32. Pethick, F. E. *et al.* Draft genome sequence of the oxytetracycline-producing bacterium *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. *Genome Announc.* **1**, 8–9 (2013).
  33. Algora-Gallardo, L., Schniete, J. K., Mark, D. R., Hunter, I. S. & Herron, P. R. Bilateral symmetry of linear streptomycete chromosomes. *Microb. Genomics* **7**, (2021).
  34. de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L. & de Araújo, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J. Infect. Dis.* **16**, 466–471 (2012).
  35. Xia, H. *et al.* The Application of Regulatory Cascades in *Streptomyces*: Yield Enhancement and Metabolite Mining. *Front. Microbiol.* **11**, 1–14 (2020).
  36. Dharmaraj, S. & Sumantha, A. Bioactive potential of *Streptomyces* associated with marine sponges. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1971–1979 (2009).
  37. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces Genetics*. (John Innes Centre Ltd., 2000).
  38. Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M. & Fortas and Rebecca Pogni, Z. *Streptomyces* Secondary Metabolites. *Basic Biol. Appl. Actinobacteria* (2018)  
doi:10.5772/intechopen.79890.
  39. Schlimpert, S., Flärdh, K. & Buttner, M. Fluorescence time-lapse imaging of the complete *S. venezuelae* life cycle using a microfluidic device. *J. Vis. Exp.* **2016**, 1–10 (2016).
  40. Flärdh, K., Richards, D. M., Hempel, A. M., Howard, M. & Buttner, M. J. Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 737–743 (2012).
  41. Hempel, A. M., Wang, S. B., Letek, M., Gil, J. A. & Flärdh, K. Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in

- Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **190**, 7579–7583 (2008).
42. Granozzi, C., Billetta, R., Passantino, R., Sollazzo, M. & Puglia, A. M. A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* **136**, 713–716 (1990).
  43. Elliot, M. *et al.* The *bldD* Gene of *Streptomyces coelicolor* A3 ( 2 ): a Regulatory Gene Involved in Morphogenesis and Antibiotic Production. **180**, 1549–1555 (1998).
  44. Pope, M. K., Green, B. D. & Westpheling, J. The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol. Microbiol.* **19**, 747–756 (1996).
  45. Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C. & Sanchez, J. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**, 118–125 (2007).
  46. Manteca, Á. & Yagüe, P. *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism. *Antibiotics* **7**, 1–13 (2018).
  47. Tian, X. *et al.* Comparative genomics analysis of *Streptomyces* species reveals their adaptation to the marine environment and their diversity at the genomic level. *Front. Microbiol.* **7**, 1–16 (2016).
  48. Hopwood, D. A. Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 1–23 (2006).
  49. Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **1**, 1–7 (2010).
  50. Hutchings, M., Truman, A. & Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **51**, 72–80 (2019).
  51. Mitscher, L. A. Coevolution: Mankind and microbes. *J. Nat. Prod.* **71**, 497–509 (2008).
  52. Craney, A., Ahmed, S. & Nodwell, J. Towards a new science of secondary metabolism. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **66**, 387–400 (2013).
  53. Fischbach, M. A., Walsh, C. T. & Clardy, J. The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4601–4608 (2008).
  54. Laskaris, P., Tolba, S., Calvo-Bado, L. & Wellington, L. Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. *Environ. Microbiol.* **12**, 783–796 (2010).

55. Berdi, J. J. 58(1): 1–26, 2005. *J. Antibiot. Antibiot.* **58**, 1–26 (2005).
56. Syed, D. G., Agasar, D. & Pandey, A. Production and partial purification of  $\alpha$ -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 189–194 (2009).
57. Liu, Z., Zhao, Y., Huang, C. & Luo, Y. Recent Advances in Silent Gene Cluster Activation in *Streptomyces*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 1–10 (2021).
58. Rutledge, P. J. & Challis, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 509–523 (2015).
59. Risdian, C., Mozef, T. & Wink, J. Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms* **7**, 1–18 (2019).
60. Hertweck, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 4688–4716 (2009).
61. Nelson, M. L. & Levy, S. B. The history of the tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1241**, 17–32 (2011).
62. Chukwudi, C. U. Harvey\_Ions&FS\_ScanElectronMicrosc1972II,409-419.1980.pdf. **60**, 4433–4441 (2016).
63. Rusu, A. & Buta, E. L. The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
64. Zhang, W., Ames, B. D., Tsai, S. & Tang, Y. Engineered Biosynthesis of a Novel Amidated Polyketide , Using the Malonamyl-Specific Initiation Module from the Oxytetracycline Polyketide Synthase. **72**, 2573–2580 (2006).
65. Pickens, L. B. & Tang, Y. Oxytetracycline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 27509–27515 (2010).
66. Lešnik, U. *et al.* Construction of a new class of tetracycline lead structures with potent antibacterial activity through biosynthetic engineering. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 3937–3940 (2015).
67. Doyle, D., McDowall, K. J., Butler, M. J. & Hunter, I. S. Characterization of an oxytetracycline-resistance gene, *otrA*, of *Streptomyces rimosus*. *Mol. Microbiol.* **5**, 2923–2933 (1991).
68. Yin, S. *et al.* Identification of a cluster-situated activator of oxytetracycline biosynthesis and manipulation of its expression for improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*. 1–12 (2015) doi:10.1186/s12934-015-0231-7.
69. Xia, H., Zhan, X., Mao, X. M. & Li, Y. Q. The regulatory cascades of antibiotic production in *Streptomyces*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1–9 (2020).

70. Tomono, A., Tsai, Y., Yamazaki, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. Transcriptional control by A-Factor of strR, the pathway-specific transcriptional activator for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**, 5595–5604 (2005).
71. Yamazaki, H., Tomono, A., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. DNA-binding specificity of AdpA, a transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. **53**, 555–572 (2004).
72. Wei, J., He, L. & Niu, G. Regulation of antibiotic biosynthesis in actinomycetes: Perspectives and challenges. *Synth. Syst. Biotechnol.* **3**, 229–235 (2018).
73. Arias, P., Ferna, M. A. & Malpartida, F. Characterization of the Pathway-Specific Positive Transcriptional Regulator for Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) as a DNA-Binding Protein. **181**, 6958–6968 (1999).
74. Wang, L. *et al.* Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8617–8622 (2009).
75. Jiang, H. & Hutchinson, C. R. Feedback regulation of doxorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Res. Microbiol.* **157**, 666–674 (2006).
76. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 155–176 (2016).
77. Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G. & Niu, G. Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. **77**, 112–143 (2013).
78. Olsen, J. V. & Mann, M. Status of Large-scale Analysis of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3444–3452 (2013).
79. Manai, M. & Cozzzone, A. J. Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 819–826 (1979).
80. Ravikumar, V., Macek, B. & Mijakovic, I. Phospho-Proteomics. **1355**, (2016).
81. Pereira, S. F. F., Goss, L. & Dworkin, J. Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 192–212 (2011).
82. Hauser, A., Penkert, M. & Hackenberger, C. P. R. Chemical Approaches to Investigate Labile Peptide and Protein Phosphorylation. *Acc. Chem. Res.* **50**, 1883–1893 (2017).
83. Mijakovic, I., Grangeasse, C. & Turgay, K. Exploring the diversity of protein modifications: Special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 398–417 (2016).
84. Jung, K., Fried, L., Behr, S. & Heermann, R. Histidine kinases and response regulators



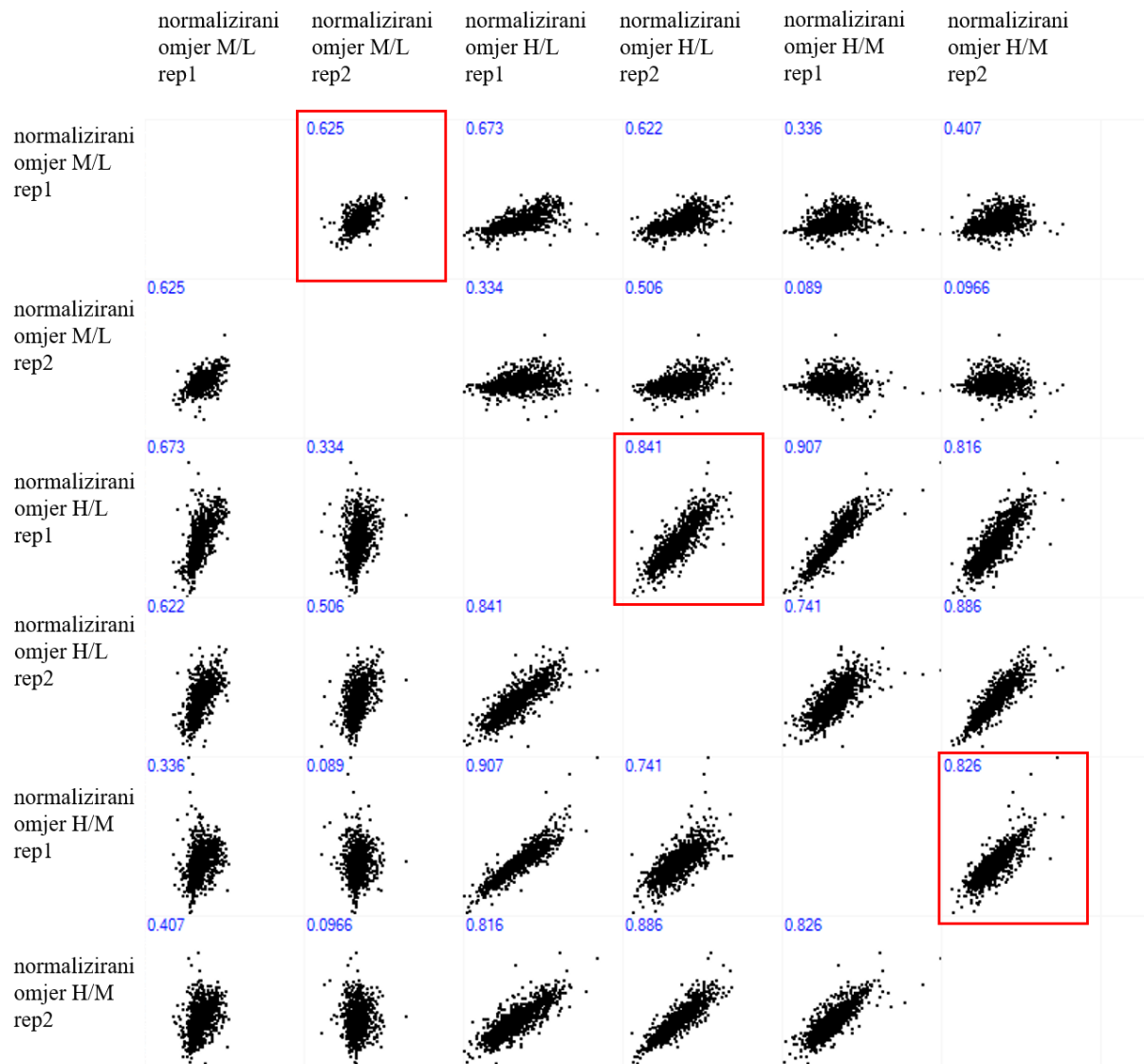
- in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 118–124 (2012).
85. Fridman, M. *et al.* Two unique phosphorylation-driven signaling pathways crosstalk in staphylococcus aureus to modulate the cell-wall charge: Stk1/Stp1 meets GraSR. *Biochemistry* **52**, 7975–7986 (2013).
  86. Rogasch, K. *et al.* Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different Staphylococcus aureus strains. *J. Bacteriol.* **188**, 7742–7758 (2006).
  87. Janczarek, M., Vinardell, J. M., Lipa, P. & Karaś, M. Hanks-type serine/threonine protein kinases and phosphatases in bacteria: Roles in signaling and adaptation to various environments. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
  88. Hanks, S. K. & Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1. *FASEB J.* **9**, 576–596 (1995).
  89. Kornev, A. P. & Taylor, S. S. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 440–444 (2010).
  90. Zucchini, L. *et al.* PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of Streptococcus pneumoniae. *Nat. Microbiol.* **3**, 197–209 (2018).
  91. Mijakovic, I., Petranovic, D., Bottini, N., Deutscher, J. & Jensen, P. R. Protein-tyrosine phosphorylation in Bacillus subtilis. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 189–197 (2006).
  92. Grangeasse, C., Nessler, S. & Mijakovic, I. Bacterial tyrosine kinases: Evolution, biological function and structural insights. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**, 2640–2655 (2012).
  93. Rausch, M. *et al.* Coordination of capsule assembly and cell wall biosynthesis in Staphylococcus aureus. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
  94. Olivares-Illana, V. *et al.* Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from Staphylococcus aureus. *PLoS Biol.* **6**, 1321–1331 (2008).
  95. Sun, C. F., Li, Y. Q. & Mao, X. M. Regulation of protein post-translational modifications on metabolism of actinomycetes. *Biomolecules* **10**, 1–18 (2020).
  96. Rajagopalan, K. & Dworkin, J. Identification and biochemical characterization of a novel eukaryotic- like Ser / Thr kinase in E . coli Present address : Division of Biological Sciences , University of California , San Diego ,. (2020).
  97. Kennelly, P. J. Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: A genomic perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 1–8 (2002).
  98. Kirstein, J. & Turgay, K. A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in

- signal transduction in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 182–188 (2006).
99. Fuhrmann, J. *et al.* McsB Is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator ctsr. *Science* (80-. ). **324**, 1323–1327 (2009).
  100. Macek, B., Mann, M. & Olsen, J. V. Global and Site-Specific Quantitative Phosphoproteomics: Principles and Applications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 199–221 (2008).
  101. Pristic, S. *et al.* Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7521–7526 (2010).
  102. Ramos, J. L. *et al.* The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 326–356 (2005).
  103. Richard-Greenblatt, M. & Av-Gay, Y. Epigenetic phosphorylation control of *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. *Tuberc. Tuberc. Bacillus Second Ed.* **5**, 557–580 (2017).
  104. Tanaka, A., Takano, Y., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. AfsR Recruits RNA Polymerase to the afsS Promoter : A Model for Transcriptional Activation by SARP. 322–333 (2007) doi:10.1016/j.jmb.2007.02.096.
  105. Horinouchi, S. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 462–467 (2003).
  106. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* **2**, 1896–1906 (2007).
  107. Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A. J. R. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* **4**, 484–494 (2009).
  108. Filla, J. & Honys, D. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids* **43**, 1025–1047 (2012).
  109. Cox, J. *et al.* Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **10**, 1794–1805 (2011).
  110. Elias, J. E. & Gygi, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* **4**, 207–214 (2007).

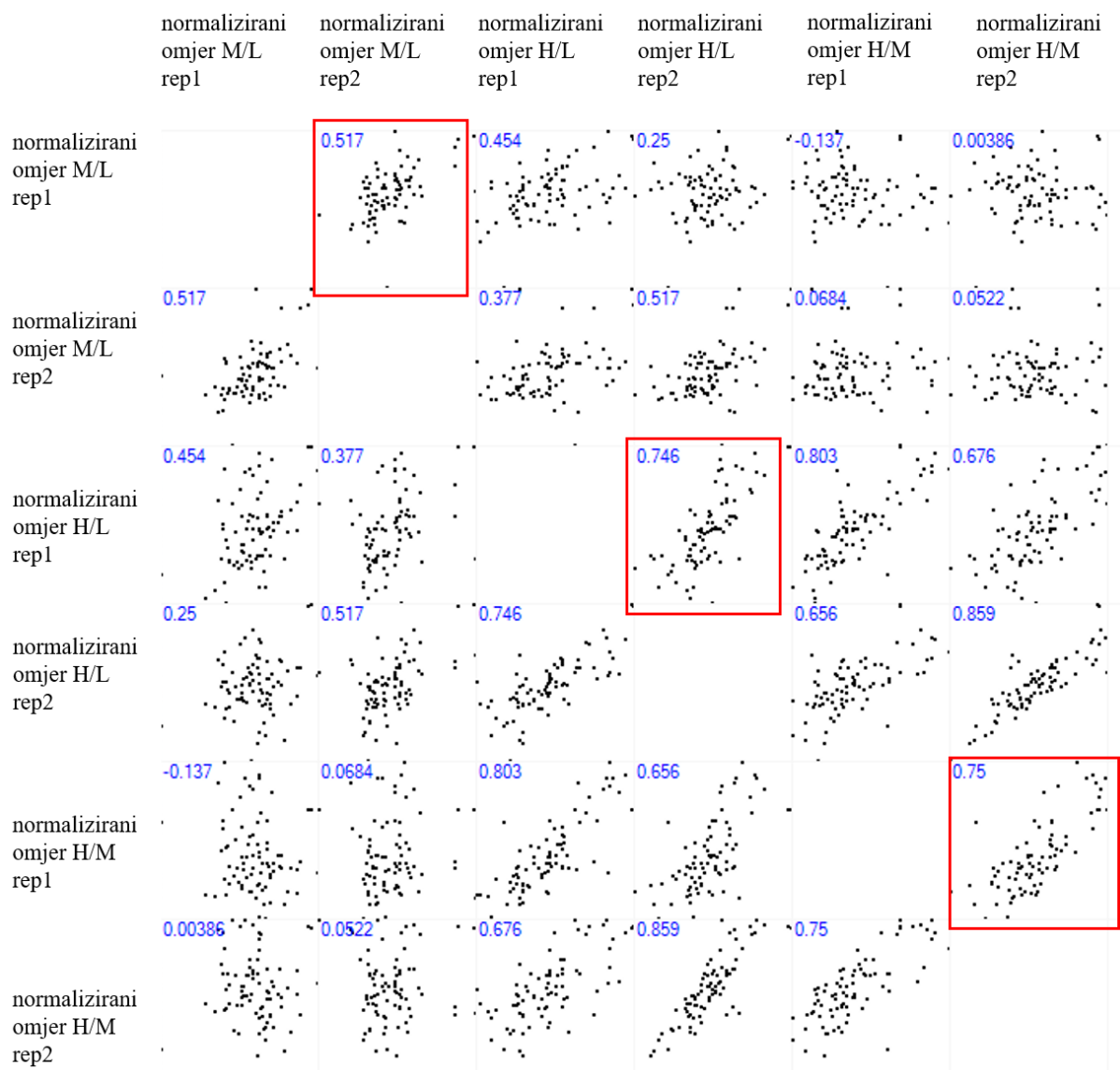
111. Tyanova, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**, 731–740 (2016).
112. Hustoft, H. K. *et al.* A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics. *Integr. Proteomics* 73–92 (2010) doi:10.5772/2473.
113. Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P. & Huerta-Cepas, J. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol. Biol. Evol.* **38**, 5825–5829 (2021).
114. Holt, T. G. *et al.* Global changes in gene expression related to antibiotic synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Mol. Microbiol.* **6**, 969–980 (1992).
115. Salah-Bey, K., Blanc, V. & Thompson, C. J. Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (*ptr*) in various *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **17**, 1001–1012 (1995).
116. Blanco, G. *et al.* Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **12**, 375–385 (1994).
117. Puglia, A. M., Vohradsky, J. & Thompson, C. J. Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **17**, 737–746 (1995).
118. Neumann, T., Piepersberg, W. & Distler, J. Decision phase regulation of streptomycin production in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **142**, 1953–1963 (1996).
119. Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P. & Sanchez, J. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3877–3886 (2008).
120. Manteca, A., Jung, H. R., Schwaömmle, V., Jensen, O. N. & Sanchez, J. Quantitative proteome analysis of *streptomyces coelicolor* nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures. *J. Proteome Res.* **9**, 4801–4811 (2010).
121. Spät, P., Klotz, A., Rexroth, S., Maček, B. & Forchhammer, K. Chlorosis as a developmental program in cyanobacteria: The proteomic fundament for survival and awakening. *Mol. Cell. Proteomics* **17**, 1650–1669 (2018).
122. Zittlau, K. I. *et al.* Temporal Analysis of Protein Ubiquitylation and Phosphorylation During Parkin-Dependent Mitophagy. *Mol. Cell. Proteomics* **21**, 100191 (2022).
123. Goulet, M.-A. & Cousineau, D. The Power of Replicated Measures to Increase Statistical Power. *Adv. Methods Pract. Psychol. Sci.* **2**, 199–213 (2019).
124. Larsen, M. R. Improved Detection of Hydrophilic Phosphopeptides Using Graphite Powder Microcolumns and Mass Spectrometry: Evidence for in Vivo Doubly

- Phosphorylated Dynamin I and Dynamin III. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 456–465 (2004).
125. Borovok, I. *et al.* Streptomyces spp. contain class Ia and class II ribonucleotide reductases: Expression analysis of the genes in vegetative growth. *Microbiology* **148**, 391–404 (2002).
  126. Bennison, D. J. *et al.* The Stringent Response Inhibits 70S Ribosome Formation in Staphylococcus aureus by Impeding GTPase-Ribosome Interactions. *MBio* **12**, 1–23 (2021).
  127. Kaur, G. *et al.* Mycobacterium tuberculosis CarD, an essential global transcriptional regulator forms amyloid-like fibrils. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
  128. Müller, A. U. & Weber-Ban, E. The bacterial proteasome at the core of diverse degradation pathways. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 1–7 (2019).
  129. Smirnova, G. V. & Oktyabrsky, O. N. Glutathione in bacteria. *Biokhimiya* **70**, 1459–1473 (2005).
  130. Soares, N. C., Spät, P., Krug, K. & MacEk, B. Global dynamics of the Escherichia coli proteome and phosphoproteome during growth in minimal medium. *J. Proteome Res.* **12**, 2611–2621 (2013).
  131. Häuser, R. *et al.* RsFA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
  132. Zhu, Y. *et al.* A novel XRE family regulator that controls antibiotic production and development in Streptomyces coelicolor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 10075–10089 (2020).
  133. Mikulík, K., Bobek, J., Ziková, A., Smtáková, M. & Bezouková, S. Phosphorylation of ribosomal proteins influences subunit association and translation of poly (U) in Streptomyces coelicolor. *Mol. Biosyst.* **7**, 817–823 (2011).
  134. Garcia-Garcia, T. *et al.* Role of protein phosphorylation in the regulation of cell cycle and DNA-related processes in bacteria. *Front. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016).
  135. Karničar, K. *et al.* Integrated omics approaches provide strategies for rapid erythromycin yield increase in Saccharopolyspora erythraea. *Microb. Cell Fact.* **15**, 1–17 (2016).

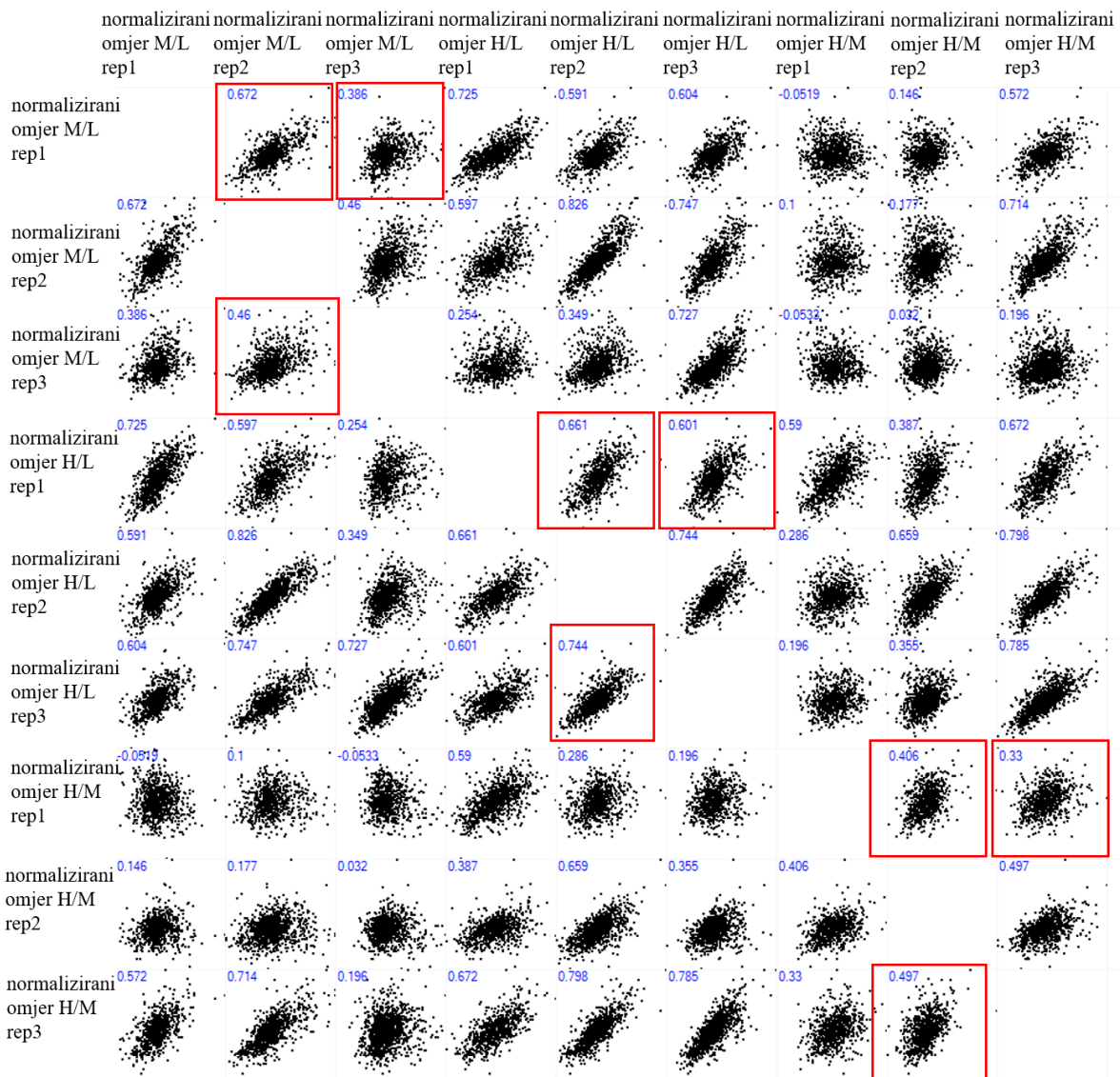
## 8. PRILOZI



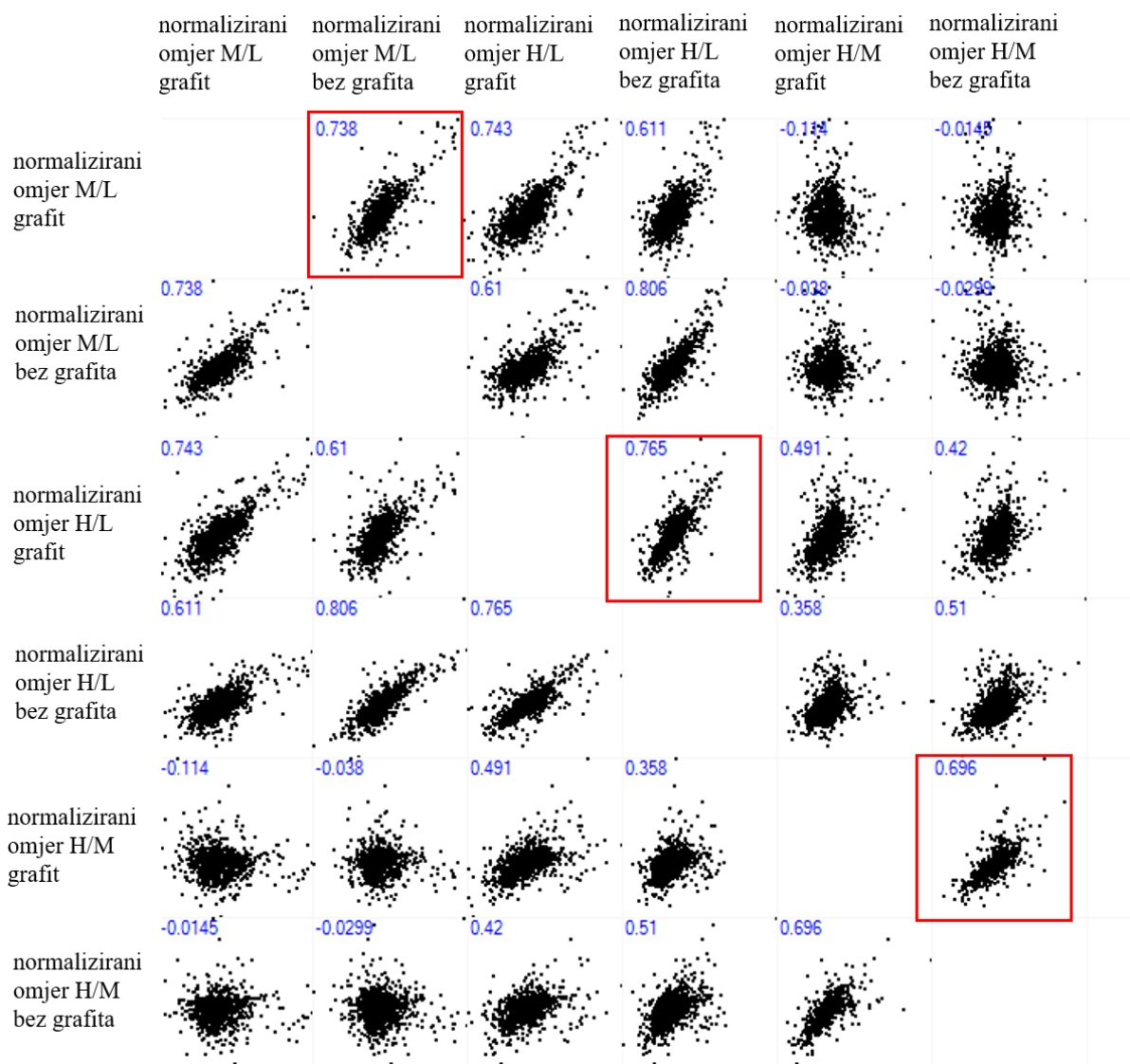
**Slika P 1.** Korelacije izmjerenih omjera proteina između dva biološka replikata za soj G7 s izračunatim Pearsonovim koeficijentom. Crveni kvadrati označavaju koeficijente izračunate za omjere M/L između dva replikata, H/L i H/M (redom odozgor nadolje).



**Slika P 2.** Korelacije izmjerenih omjera fosfoproteina između dva biološka replikata za soj G7 s izračunatim Pearsonovim koeficijentom. Crveni kvadrati označavaju koeficijente izračunate za omjere M/L između dva replikata, H/L i H/M (redom odozgor nadolje).



**Slika P 3.** Korelacije izmjerenih omjera fosfoproteina između tri biološka replikata za soj 23383 s izračunatim Pearsonovim koeficijentom.



**Slika P 4.** Korelacije izmjerenih omjera proteina između dva ista uzorka, od kojih je jedan pročišćen preko grafita, za soj 23383 s izračunatim Pearsonovim koeficijentom.



**Tablica P 1.** Popis svih proteina unutar svakog klastera, svrstanih u funkcionalne kategorije i podkategorije (zelena boja – klaster A, plava boja – klaster B, narančasta boja – klaster C, ljubičasta boja – klaster D, žuta boja – klaster E).

Locus tag	Ime proteina	Funkcionalna kategorija	Funkcionalna podkategorija
SRIM_003240	6-phosphofructokinase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_008445	molecular chaperone HtpG	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_009220	cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_009490	SUF system NifU family Fe-S cluster assembly protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_015250	amino acid permease	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_018675	transcription termination/antitermination protein NusG	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_020425	cobaltochelataze subunit CobN	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_021055	DNA-binding protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_025045	glutamine-hydrolyzing GMP synthase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_025645	succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_026260	RidA family protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_028255	cellulose-binding protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_030530	ADP-ribosylglycohydrolase family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_030870	flotillin family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_032050	ABC transporter ATP-binding protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_032385	DNA alkylation response protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_007910	helix-turn-helix transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_009210	cobyric acid synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_022700	cytochrome c oxidase subunit I	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_023455	dihydropteroate synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_004875	RNA polymerase sigma factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription

SRIM_000805	argininosuccinate synthase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_001715	FAD-dependent monooxygenase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism; <b>Energy production and conversion</b>
SRIM_002665	ribonuclease HI	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_003145	ABC-ATPase domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_004075	formate C-acetyltransferase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_004085	pyridoxamine 5-phosphate oxidase family protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_004125	protoporphyrinogen oxidase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_004130	NarK/NasA family nitrate transporter	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_004135	respiratory nitrate reductase subunit gamma	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_004140	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_004145	nitrate reductase subunit beta	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_004805	SigB/SigF/SigG family RNA polymerase sigma factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_005050	D-alanine--D-alanine ligase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_005060	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_006290	DinB family protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_006330	electron transfer flavoprotein subunit beta/FixA family protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_006365	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_006520	NAD(P)-binding protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_006645	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_006760	alanine--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_006795	vitamin K epoxide reductase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_006860	YebC/PmpR family DNA-binding transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_006920	HIT domain-containing protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism; <b>Nucleotide transport and metabolism</b>

SRIM_007070	nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_007095	ATP-binding cassette domain-containing protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_007150	argininosuccinate synthase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007215	acetylornithine transaminase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007225	bifunctional glutamate N-acetyltransferase/amino-acid acetyltransferase ArgJ	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007230	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007455	50S ribosomal protein L20	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_007460	50S ribosomal protein L35	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_007550	ABC transporter permease subunit	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007555	glycine betaine/L-proline ABC transporter ATP-binding protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007695	ABC transporter substrate-binding protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007730	glycerol-3-phosphate dehydrogenase/oxidase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_009215	putative cobaltochelataase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_009260	diaminobutyrate acetyltransferase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_009265	diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_009505	non-heme iron oxygenase ferredoxin subunit	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_009590	RNA polymerase-binding protein RbpA	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_009625	DNA-binding protein WhiA	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_010125	prolipoprotein diacylglyceryl transferase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_010165	anthranilate synthase component I	METABOLISM	<b>Amino acid transport and metabolism</b> ;Coenzyme transport and metabolism
SRIM_010260	histidinol-phosphate transaminase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010320	thioredoxin domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_010340	dienelactone hydrolase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

SRIM_010375	DivIVA domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_010385	cell division protein SepF	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_010435	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_010625	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_010650	ROK family glucokinase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING;METABOLISM	<b>Carbohydrate transport and metabolism;</b> Transcription
SRIM_010680	glycosyltransferase family 4 protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_010740	Rieske 2Fe-2S domain-containing protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_010745	c-type cytochrome	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_010800	quinolinate synthase NadA	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_010990	lipoyl synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_011000	DUF4191 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_011325	ATP-binding cassette domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_011400	type I methionyl aminopeptidase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_011570	helix-turn-helix transcriptional regulator		
SRIM_012010	HAD family hydrolase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_012080	bifunctional RNase H/acid phosphatase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING;METABOLISM	<b>Carbohydrate transport and metabolism;</b> Replication, recombination and repair
SRIM_012190	class I SAM-dependent methyltransferase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_012200	hypothetical protein		
SRIM_012440	HAD-IA family hydrolase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_012685	peroxiredoxin	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_012775	ACP S-malonyltransferase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_012780	ketoacyl-ACP synthase III	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_013075	adenosine deaminase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_013365	isoprenyl transferase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism

SRIM_013545	molecular chaperone DnaJ	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_013600	elongation factor 4	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_013605	30S ribosomal protein S20	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_013770	50S ribosomal protein L27	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_013795	TIGR03960 family B12-binding radical SAM protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_013870	valine--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_013885	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_014065	acyl-ACP desaturase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_014260	Cys-Gln thioester bond-forming surface protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	<b>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b> ;Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SRIM_014300	ATP-binding protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_014310	roadblock/LC7 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_014485	heavy-metal-associated domain-containing protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_014685	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_015130	co-chaperone GroES	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_015460	integration host factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_015625	UDP-glucose 4-epimerase GalE	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_015990	acyl-CoA dehydrogenase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_016015	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide synthase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_016210	cystathionine beta-synthase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_016410	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_016445	bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamin e-1-phosphate N-acetyltransferase GlmU	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis

SRIM_016550	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_016565	16S rRNA (adenine(1518)-N(6)/adenine(1519)-N(6))-dimethyltransferase RsmA	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_016575	TatD family hydrolase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_017005	L,D-transpeptidase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_017690	DNA helicase RecQ	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_018030	hypothetical protein		
SRIM_018385	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_018445	30S ribosomal protein S11	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_018495	50S ribosomal protein L18	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_018575	50S ribosomal protein L4	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_018645	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_018650	50S ribosomal protein L7/L12	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_018670	50S ribosomal protein L11	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_018680	preprotein translocase subunit SecE	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SRIM_018710	MaoC family dehydratase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_018880	polyprenyl synthetase family protein	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_019045	menaquinone biosynthesis protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_019050	cold-shock protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_019130	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_019140	PLDc_N domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_019265	SDR family oxidoreductase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_019350	arginine--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis

SRIM_019415	bifunctional uroporphyrinogen-III C-methyltransferase/uroporphyrinogen-III synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_019420	hydroxymethylbilane synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_019425	glutamyl-tRNA reductase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_019790	DUF3073 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_019800	amidophosphoribosyltransferase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_019825	phosphoribosylformylglycin amidine synthase subunit PurQ	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_019830	phosphoribosylformylglycin amidine synthase subunit PurS	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_019980	SAM-dependent DNA methyltransferase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_020235	TetR/AcrR family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_020535	VWA domain-containing protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_020570	aspartate--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_020590	SseB family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_020785	pyridoxamine 5-phosphate oxidase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_020945	FMN-dependent NADH-azoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_021080	DUF3566 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_021150	AAA family ATPase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_021195	murein biosynthesis integral membrane protein MurJ	<b>CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING</b> ; INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair; <b>Signal transduction mechanisms</b> ; Transcription
SRIM_021220	inositol-3-phosphate synthase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_021245	aminoacyltransferase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_021260	single-stranded DNA-binding protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_021520	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_021540	PadR family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription

SRIM_021695	prephenate dehydratase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_021765	topoisomerase II	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_022155	hypothetical protein		
SRIM_022660	class I SAM-dependent methyltransferase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_023215	arylamine N-acetyltransferase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_023535	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_024070	asparaginase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_024360	CarD family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_024365	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_024625	DEAD/DEAH box helicase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_024980	formyltetrahydrofolate deformylase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_025400	aldehyde dehydrogenase family protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_025545	tryptophan--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_025640	succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor subunit	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_025760	glycosyltransferase family 2 protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_025855	adenosine deaminase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_026025	septum formation inhibitor Maf	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_026125	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_026145	MarR family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_026445	peroxiredoxin	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_026475	PadR family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_026515	class I SAM-dependent methyltransferase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_026530	fumarate hydratase	METABOLISM	Energy production and conversion



SRIM_026545	class II fructose-bisphosphatase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_026555	malonic semialdehyde reductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_026575	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING;METABOLISM	Cell wall/membrane/envelope biogenesis; <b>Lipid transport and metabolism</b>
SRIM_026945	Mrp/NBP35 family ATP-binding protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_027165	AarF/ABC1/UbiB kinase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_027185	AIM24 family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_027345	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_027350	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_027470	GNAT family N-acetyltransferase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_027505	glutaminase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_027860	DUF742 domain-containing protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_027930	cytochrome P450	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_028125	FOF1 ATP synthase subunit B	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_028180	cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_028240	ATP-binding cassette domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_028260	hypothetical protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_028350	methylmalonyl-CoA mutase family protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_029000	phospholipase C, phosphocholine-specific	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_029085	proline dehydrogenase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_029090	L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_029150	acyl-CoA carboxylase subunit beta	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_029195	ATP/GTP-binding protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_029205	roadblock/LC7 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown

SRIM_029220	glutamate--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_029350	NAD(P)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_029355	D-alanine--D-alanine ligase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_029475	cytosine permease	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_029685	23S rRNA (adenine(2503)-C(2))-methyltransferase RlmN	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_029865	4-aminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_029915	site-2 protease family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_029920	flavodoxin-dependent (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_029935	proline--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_029985	tRNA pseudouridine(55) synthase TruB	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_030005	type VII secretion protein EccE	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_030015	WXG100 family type VII secretion target	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_030035	hypothetical protein		
SRIM_030115	type VII secretion protein EccC	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_030120	type VII secretion integral membrane protein EccD	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_030135	insulinase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_030160	FAD-dependent thymidylate synthase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_030215	DNA translocase FtsK	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_030380	cold-shock protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_030440	GTPase HflX	<b>CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING;INFORMATION STORAGE AND PROCESSING</b>	<b>Signal transduction mechanisms;Transcription</b>
SRIM_030470	ATP-dependent DNA helicase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	<b>Replication, recombination and repair;Transcription</b>
SRIM_030485	vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism

SRIM_030580	RNA polymerase sigma factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_030590	hypothetical protein		
SRIM_030695	phosphodiesterase		
SRIM_030850	TrkA family potassium uptake protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_030865	hypothetical protein		
SRIM_031230	hypothetical protein		
SRIM_031235	VWA domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_031515	3 terminal RNA ribose 2-O-methyltransferase Hen1	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_031780	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_031875	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism; <b>Lipid transport and metabolism</b>
SRIM_032305	trypsin-like peptidase domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_032840	GNAT family N-acetyltransferase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_032880	IcIR family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_033250	cold-shock protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_033590	peptidase inhibitor family I36 protein		
SRIM_034735	RNA-binding transcriptional accessory protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_034830	CDP-alcohol phosphatidyltransferase family protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_034865	polyprenyl synthetase family protein	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_034945	MBL fold metallo-hydrolase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_035660	terpene synthase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	<b>Cell motility</b> ;Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SRIM_035825	bifunctional lysylphosphatidylglycerol synthetase/lysine--tRNA ligase LysX	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_036310	non-ribosomal peptide synthetase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_036380	DUF2510 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_038530	SAM-dependent methyltransferase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

SRIM_040360	cytochrome P450	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_001475	amidase domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_005240	DUF881 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_006890	phosphatidylinositol mannoside acyltransferase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_012085	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_012840	ribokinase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_013710	histidine phosphatase family protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_014250	acyl-CoA thioesterase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_018640	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_018660	hypothetical protein		
SRIM_019105	aminofutalosine synthase MqnE	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_021815	hypothetical protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_023585	L-aspartate oxidase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_027320	sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_029185	roadblock/LC7 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_029610	signal peptidase I	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SRIM_031510	LLM class F420-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_036295	GSCFA domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_002900	erythromycin esterase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_005280	PTS glucose transporter subunit IIA	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_006205	dipeptidase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_006355	low specificity L-threonine aldolase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_006360	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_007720	aquaporin family protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_007905	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	CELLULAR PROCESSES AND	<b>Carbohydrate transport and metabolism;Cell</b>

		SIGNALING;METABOLISM	wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_009610	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_010040	alpha/beta hydrolase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_010945	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_013495	MBL fold metallo-hydrolase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_013915	arsenate reductase family protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_014665	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_014670	acyl-CoA dehydrogenase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_015725	ribosome-associated translation inhibitor RaiA	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_016005	membrane dipeptidase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_016115	urocanate hydratase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_016615	hypothetical protein		
SRIM_016955	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_020050	DUF3151 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_021045	DUF5324 family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_021085	DNA gyrase subunit A	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_022340	uracil phosphoribosyltransferase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_022905	RidA family protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_024350	copper chaperone PCu(A)C		
SRIM_026055	enoyl-CoA hydratase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_026065	histidine ammonia-lyase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_028915	NADP-specific glutamate dehydrogenase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_029335	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_032935	cytochrome P450	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_033200	isochorismatase family protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_034745	hypothetical protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_034850	squalene synthase HpnC	METABOLISM	Lipid transport and metabolism

SRIM_034855	presqualene diphosphate synthase HpnD	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_034880	adenosyl-hopene transferase HpnH	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_034890	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism; <b>Lipid transport and metabolism</b>
SRIM_035275	triphosphoribosyl-diphospho-CoA synthase MdcB	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_036555	AMP-binding protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_002105	EF-hand domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning;Cytoskeleton; <b>Signal transduction mechanisms</b>
SRIM_009255	amidohydrolase family protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_009585	glucose-6-phosphate isomerase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_009890	hotdog fold thioesterase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_010395	peptidoglycan editing factor PgeF	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_016105	formimidoylglutamate deiminase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_016110	allantoate amidohydrolase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_020825	molybdopterin molybdotransferase MoeA	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_021350	alanine--glyoxylate aminotransferase family protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_031700	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_035055	transketolase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_007080	GNAT family N-acetyltransferase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_007085	ABC transporter substrate-binding protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_008855	lysine N(6)-hydroxylase/L-ornithine N(5)-oxygenase family protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_010235	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010255	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase HisB	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010430	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis

SRIM_010725	aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_012285	hypothetical protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_015750	response regulator transcription factor	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_019290	DUF3558 domain-containing protein		
SRIM_020130	molecular chaperone DnaJ	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_020400	TerD family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_023220	RidA family protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_023950	phosphate ABC transporter permease subunit PstC	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_024185	response regulator transcription factor	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_024245	bifunctional metallophosphatase/5-nucleotidase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_024995	STAS domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_025905	aldehyde dehydrogenase family protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_026685	translational GTPase TypA	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_027980	acyl-CoA dehydrogenase family protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_028010	non-ribosomal peptide synthetase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_031210	isochorismate synthase Dhbc	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_031945	thiolase family protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_032340	sulfate adenylyltransferase subunit CysD	METABOLISM	<b>Amino acid transport and metabolism</b> ;Coenzyme transport and metabolism
SRIM_009370	TerD family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_027970	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase family protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_030660	insulinase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_040650	hypothetical protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair

SRIM_040750	M28 family peptidase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	<b>Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning;</b> Cytoskeleton
SRIM_016400	cellulose-binding protein		
SRIM_026155	ATP-binding cassette domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_032045	indole-3-glycerol phosphate synthase		
SRIM_001145	amino acid adenylation domain-containing protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_001155	2,3-diaminopropionate biosynthesis protein SbnB	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_001195	glycine amidinotransferase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_001845	SRPBCC family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_001930	carboxymuconolactone decarboxylase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_002895	SDR family oxidoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_003575	alpha/beta hydrolase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_003835	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_004300	ornithine decarboxylase	METABOLISM;POORLY CHARACTERIZED	<b>Amino acid transport and metabolism;</b> Function unknown
SRIM_004305	cysteine hydrolase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_004420	NAD(P)H-dependent oxidoreductase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_004425	SDR family oxidoreductase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_004430	SDR family oxidoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_004435	hypothetical protein		
SRIM_004440	DUF2795 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_004620	hypothetical protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_004810	catalase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_004825	hypothetical protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_004920	GNAT family N-acetyltransferase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription



SRIM_005160	helix-turn-helix transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_005255	NTP transferase domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING; INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis; <b>Translation, ribosomal structure and biogenesis</b>
SRIM_005295	acetoacetate--CoA ligase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_005660	alpha/beta hydrolase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_005915	dihydroxyacetone kinase subunit DhaK	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_005920	dihydroxyacetone kinase subunit L	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_006380	VOC family protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_006450	ATP phosphoribosyltransferase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_006550	GuaB1 family IMP dehydrogenase-related protein	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_006600	methionyl-tRNA formyltransferase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_006655	integration host factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_006740	chorismate synthase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_006910	hypothetical protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_006990	aminodeoxychorismate lyase	METABOLISM	<b>Amino acid transport and metabolism</b> ; Coenzyme transport and metabolism
SRIM_007120	glycerophosphodiester phosphodiesterase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_007210	arginine repressor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_007295	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_007510	aldehyde dehydrogenase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_007565	siderophore-interacting protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_007640	proteasome subunit alpha	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_007645	proteasome subunit beta	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_007650	ubiquitin-like protein Pup	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_007655	proteasome accessory factor PafA2	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown

SRIM_007660	proteasome ATPase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_007690	response regulator transcription factor	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_007710	methionine synthase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007735	hypothetical protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_007755	amidohydrolase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_007845	MSMEG_4193 family putative phosphomutase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_007895	M20/M25/M40 family metallo-hydrolase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_008085	NUDIX domain-containing protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_008155	amidase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_008240	homogentisate 1,2-dioxygenase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_008525	proteinase inhibitor I78	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_008725	NUDIX hydrolase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_008735	glycoside hydrolase family 15 protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_008795	NAD kinase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_008830	ABC transporter substrate-binding protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_008900	YbhB/YbcL family Raf kinase inhibitor-like protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_008915	SPFH/Band 7/PHB domain protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_008990	histidine phosphatase family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_009125	hypothetical protein		
SRIM_009145	hypothetical protein		
SRIM_009155	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_009170	glyoxalase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_009180	prolyl oligopeptidase family serine peptidase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_009405	DUF839 domain-containing protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_009555	transketolase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_009560	transaldolase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_009565	glucose-6-phosphate dehydrogenase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism

SRIM_009570	glucose-6-phosphate dehydrogenase assembly protein OpcA	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_009575	6-phosphogluconolactonase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_009605	phosphoglycerate kinase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_009715	maleylpyruvate isomerase family mycothiol-dependent enzyme	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_009920	response regulator	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_009960	aminopeptidase N	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010145	indole-3-glycerol phosphate synthase TrpC	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010175	TIGR03085 family protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_010245	bifunctional 1-(5-phosphoribosyl)-5-((5-phosphoribosylamino)methylideneamino)imidazole-4-carboxamide isomerase/phosphoribosylanthranilate isomerase PriA	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010250	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010480	methyltransferase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_010525	thiamine phosphate synthase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_010535	oxidoreductase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_010575	bacterioferritin	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_010605	2-hydroxyacid dehydrogenase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism; <b>Energy production and conversion</b>
SRIM_010665	SRPBCC family protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_010720	Lrp/AsnC family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_010730	anthranilate phosphoribosyltransferase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_010865	bifunctional adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_010970	TIGR01777 family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_011225	glycoside hydrolase family 13 protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism

SRIM_011240	bifunctional	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	<b>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</b> ;Signal transduction mechanisms
SRIM_011250	DsbA family protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_011365	NADPH-dependent F420 reductase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_012590	hypothetical protein		
SRIM_012600	hypothetical protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_012695	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_012865	organic hydroperoxide resistance protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_013020	YtxH domain-containing protein		
SRIM_013130	hemerythrin domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_013500	S-(hydroxymethyl)mycothiol dehydrogenase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_013530	OsmC family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_013540	nitronate monooxygenase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_013995	superoxide dismutase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_014005	aminopeptidase N	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_014050	aminopeptidase N	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_014055	allantoicase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_014135	xanthine dehydrogenase family protein subunit M	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_014420	3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione acylhydrolase (decyclizing)	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_014425	5-deoxy-glucuronate isomerase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_014625	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_014705	oligoribonuclease	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_014715	NAD(P)H-binding protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_014865	amidase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis

SRIM_015210	MBL fold metallo-hydrolase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_015245	M67 family metallopeptidase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_015265	nicotinate phosphoribosyltransferase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_015310	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_015320	FAD-binding protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_015680	NAD-glutamate dehydrogenase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism; <b>Carbohydrate transport and metabolism</b>
SRIM_015755	S-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_015830	mannose-6-phosphate isomerase, class I	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_015835	mannose-6-phosphate isomerase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_015845	phosphomannomutase/phosphoglucomutase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_016100	imidazolonepropionase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_016215	SGNH/GDSL hydrolase family protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_016220	acetyl-CoA C-acetyltransferase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_016300	class I SAM-dependent methyltransferase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_016390	transcription-repair coupling factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_016875	molybdopterin molybdotransferase MoeA	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_016970	amidohydrolase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_017840	LLM class F420-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_018000	TetR/AcrR family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_018200	glycerol-3-phosphate dehydrogenase/oxidase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_018375	bifunctional ADP-dependent NAD(P)H-hydrate dehydratase/NAD(P)H-hydrate epimerase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_018470	adenylate kinase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_018690	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_018735	SDR family oxidoreductase	CELLULAR PROCESSES AND	Carbohydrate transport and metabolism; <b>Cell</b>

		SIGNALING;METABOLISM	<b>wall/membrane/envelope biogenesis</b>
SRIM_018750	hypothetical protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_018965	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_018975	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_019020	Uma2 family endonuclease	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_019025	hypothetical protein	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_019160	hypothetical protein		
SRIM_019210	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_019330	glycoside hydrolase family 65 protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_019595	aldo/keto reductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_019805	maleylpyruvate isomerase family mycothiol-dependent enzyme	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_020110	ATP-dependent chaperone ClpB	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_020480	precorrin-4 C(11)-methyltransferase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_020675	carbon-nitrogen family hydrolase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_020700	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_020780	response regulator transcription factor	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_020820	potassium channel family protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_020835	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_021040	peptidylprolyl isomerase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_021105	decarboxylating 6-phosphogluconate dehydrogenase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_021410	cystathionine gamma-lyase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_021480	histidinol-phosphate transaminase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_022515	alanine--tRNA ligase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SRIM_023045	DEAD/DEAH box helicase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_023050	anti-sigma factor antagonist BldG	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms

SRIM_023345	glutamate decarboxylase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_023350	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_023355	methyltransferase domain-containing protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_023420	zinc-dependent metalloprotease	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_023470	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine diphosphokinase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_023670	response regulator transcription factor	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_023705	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING;METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism; <b>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>
SRIM_023805	pyrroline-5-carboxylate reductase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_024020	VOC family protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_024085	folate-binding protein YgfZ	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_024130	sulfurtransferase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_024135	DUF2993 domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_024515	trehalose-phosphatase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_024520	trehalose-6-phosphate synthase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_024530	threonine synthase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_024535	MoaD/ThiS family protein	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_024680	1,4-dihydroxy-6-naphthoate synthase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_024715	HAD-IC family P-type ATPase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_024905	citrate synthase 2	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_025505	carboxymuconolactone decarboxylase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_025530	ornithine--oxo-acid transaminase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_025955	gamma-glutamylcyclotransferase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_025960	NAD(P)H-quinone dehydrogenase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_026040	acyl-CoA carboxylase subunit beta	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_026120	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase MsrA	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones

SRIM_026195	thioredoxin domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_026505	catalase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_026525	class II fumarate hydratase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_026795	S9 family peptidase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_026880	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_027000	NYN domain-containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_027005	alpha/beta hydrolase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_027135	mycoredoxin	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_027220	PDZ domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_027260	catalase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_027465	anti-sigma regulatory factor	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_027495	hypothetical protein		
SRIM_027690	zinc-binding dehydrogenase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_028100	serine hydroxymethyltransferase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_028250	ATP-binding cassette domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_028265	methylmalonyl-CoA epimerase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_028325	MTH1187 family thiamine-binding protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_028435	acetate kinase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_028440	phosphate acetyltransferase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_028445	6-phosphofructokinase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_028720	ammonia-dependent NAD(+) synthetase	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_028900	aldo/keto reductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_029105	3-isopropylmalate dehydrogenase	METABOLISM	<b>Amino acid transport and metabolism;</b> Energy production and conversion
SRIM_029135	citramalate synthase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_029315	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_029690	thiamine ABC transporter substrate-binding protein	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_029760	adenosine deaminase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism



SRIM_030170	ribonuclease J	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_030205	HAMP domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_030245	DNA starvation/stationary phase protection protein	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_030255	PPOX class F420-dependent oxidoreductase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_030640	helix-turn-helix domain-containing protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_030690	GNAT family N-acetyltransferase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_030710	VOC family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_030750	response regulator transcription factor	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_031145	iron-containing redox enzyme family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_031160	2OG-Fe dioxygenase family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_031930	FAD-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_032075	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase MsrB	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SRIM_032175	aminoglycoside phosphotransferase family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_032245	glycosyltransferase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_032290	ATP-grasp domain-containing protein	METABOLISM	<b>Amino acid transport and metabolism;</b> Nucleotide transport and metabolism
SRIM_032295	CocE/NonD family hydrolase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_032360	nitrite/sulfite reductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_032505	thiamine pyrophosphate-requiring protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism; <b>Coenzyme transport and metabolism</b>
SRIM_032520	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_032525	LLM class F420-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_032610	pyruvate dehydrogenase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism; <b>Coenzyme transport and metabolism</b>
SRIM_032720	PRC-barrel domain containing protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_032730	AMP-binding protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_032930	bifunctional 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase/2-	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism

	dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase		
SRIM_033230	FAD-dependent oxidoreductase	METABOLISM	<b>Amino acid transport and metabolism</b> ;Energy production and conversion
SRIM_033275	dihydropyrimidinase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_033315	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_033415	acyl-CoA dehydrogenase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_033620	NADP-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_033655	mandelate racemase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_033720	SfnB family sulfur acquisition oxidoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_033845	aldo/keto reductase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_033935	SDR family oxidoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_034220	antibiotic biosynthesis monooxygenase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_034895	aspartate aminotransferase family protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_035205	NADP-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_035440	dodecin family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_035545	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_035550	transketolase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_035605	L-histidine N(alpha)-methyltransferase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_036015	PPOX class F420-dependent oxidoreductase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_036075	acyl-CoA thioesterase II	METABOLISM	Lipid transport and metabolism
SRIM_036225	YjbQ family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_036285	taurine dioxygenase	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_036320	DNA polymerase domain-containing protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_036365	lactonase family protein	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_036385	uracil-DNA glycosylase	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair

SRIM_036955	hypothetical protein	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_037825	GAF and ANTAR domain-containing protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_038055	SAM-dependent methyltransferase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_038130	AMP-binding protein	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_039195	hypothetical protein		
SRIM_039380	LLM class F420-dependent oxidoreductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_004090	GAF domain-containing sensor histidine kinase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_004800	VOC family protein		
SRIM_005675	VOC family protein	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_005755	DinB family protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_005925	PTS fructose transporter subunit IIA	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_006585	transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_007130	bifunctional metallophosphatase/5-nucleotidase	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism
SRIM_007850	magnesium/cobalt transporter CorA	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism
SRIM_008215	aldehyde dehydrogenase family protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_009425	endonuclease/exonuclease/p hosphatase		
SRIM_010645	endonuclease	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_012675	TerD family protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms
SRIM_013840	rod shape-determining protein	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SRIM_014435	5-dehydro-2-deoxygluconokinase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_014530	sugar phosphate isomerase/epimerase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_016475	phosphoenolpyruvate carboxylase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_016660	peptidase S41	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SRIM_018840	response regulator transcription factor	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_018970	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	METABOLISM	Energy production and conversion

SRIM_019335	beta-phosphoglucomutase family hydrolase	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism
SRIM_026160	ABC transporter permease	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms
SRIM_029725	aspartate aminotransferase family protein	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism
SRIM_031905	peptidase M4	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_032255	SDR family oxidoreductase	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING;METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism; <b>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>
SRIM_033705	dimethyl sulfone monooxygenase SfnG	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_034930	SAM-dependent methyltransferase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_036410	DNA alkylation repair protein	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair
SRIM_038285	FAD-binding protein	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_039670	nitroreductase family deazaflavin-dependent oxidoreductase	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown
SRIM_040015	methyltransferase domain-containing protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_040680	NADPH-dependent FMN reductase	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_040710	M1 family peptidase	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism
SRIM_040805	TetR family transcriptional regulator	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription
SRIM_040810	phenylacetic acid degradation protein PaaN	METABOLISM	Energy production and conversion
SRIM_040820	SDR family oxidoreductase	METABOLISM	Lipid transport and metabolism; <b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>
SRIM_040825	NAD(P)-binding protein	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism; <b>Energy production and conversion</b>
SRIM_040830	amino acid adenylation domain-containing protein	METABOLISM	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SRIM_040940	hypothetical protein		
SRIM_041550	hypothetical protein	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism

**Tablica P 2.** Popis svih 36 značajno reguliranih pojmova (engl. *enriched annotation terms*) u četiri klastera s faktorom obogaćivanja iznad 1 i p-vrijednošću manjom od 0,05.

Obogaćena kategorija	Faktor obogaćivanja	P-vrijednost	Benj. Hoch. FDR
<b>Klaster B</b>			
RNA polimeraze	5.352	0.009383	0.17812
preniltransferaze	4.7573	0.004208	0.17812
proteini za biosintezu i degradaciju peptidoglikana	2.8544	0.0095	0.17812
integralna komponenta membrane	2.7185	0.00406	0.097359
integralna komponenta plazma membrane	2.7185	0.00406	0.097359
intrinzična komponenta membrane	2.7185	0.00406	0.097359
intrinzična komponenta plazma membrane	2.7185	0.00406	0.097359
mašinerija za transkripciju	2.5949	0.005504	0.17812
dio plazma membrane	2.4821	0.007281	0.16194
Amino acid related enzymes	2.3787	0.001152	0.086374
biogeneza staničnog zida/membrane/ovojnice	1.8831	0.002049	0.023905
ligaze	1.7608	0.004276	0.056663
transkripcija	1.6887	0.000756	0.020706
transferaze	1.4092	0.002275	0.056663
POHRANA I PROCESIRANJE INFORMACIJA	1.2545	0.007373	0.024577
STANIČNI PROCESI I SIGNALIZACIJA	1.0521	0.06474	0.11771
SLABO KARAKTERIZIRANI	1.0413	0.076525	0.11773
<b>Klaster C</b>			
transport i metabolizam lipida	2.9843	0.000986	0.020706
biosinteza, transport i katabolizam sekundarnih metabolita	2.8961	0.006656	0.058244
METABOLIZAM	1.583	4.04E-05	0.000269
<b>Klaster D</b>			
Dvokomponentni sustavi	13.67	0.008257	0.17812

mehanizmi za prijenos signala	3.7664	0.003292	0.034569
METABOLIZAM	1.0843	0.1347	0.1796
<b>Klaster E</b>			
metabolizam glutationa	4.3442	0.000491	0.17467
proteasom	3.8615	0.009015	0.17812
enzimi metabolizma 2-oksokarboksilne kiseline	2.3169	0.004262	0.17812
transport i metabolizam ugljikohidrata	1.6549	0.000793	0.020706
izomeraze	1.5797	0.021075	0.15806
metabolizam mikroba u različitoj okolini	1.4938	0.000524	0.17467
proizvodnja i pretvorba energije	1.475	0.001739	0.022825
oksidoreduktaze	1.361	0.005666	0.056663
transport i metabolizam aminokiselina	1.3556	0.00559	0.05336
PROTEINI NEPOZNATE FUNKCIJE	1.243	0.014374	0.039285
proteini nepoznate funkcije	1.243	0.014374	0.1161
METABOLIZAM	1.2115	2.53E-05	0.000253

**Tablica P 3A.** Lista proteina raspodijeljenih u funkcionalne kategorije i podkategorije prema programu eggNOG čija je ekspresija značajno povećana u fazi SI (u odnosu na fazu SIII) na temelju analize ‘‘značajnost B’’.

Broj lokusa	Ime gena	Ime proteina na engleskom jeziku
<b>STANIČNI PROCESI I SIGNALIZACIJA (16,4%)</b>		
<b>Posttranslacijske modifikacije, izmjena proteina i šaperoni (5,1%)</b>		
SRIM_041810		hypothetical protein
SRIM_041805		trypsin-like serine protease
SRIM_014925		peptidase
SRIM_007480		SseB family protein
<b>Kontrola staničnog ciklusa, stanična dioba, podjela kromosoma (2,5%)</b>		
SRIM_023600		hypothetical protein
SRIM_015560	ftsE	cell division ATP-binding protein FtsE
<b>Biogeneza staničnog zida/membrane/ovojnice (2,5%)</b>		
SRIM_025770	neuA	acylneuraminate cytidyltransferase
SRIM_015455	murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
<b>Mehanizmi obrane (1,3%)</b>		

SRIM_028240		ATP-binding cassette domain-containing protein
<b>Mehanizmi prijenosa signala (5,1%)</b>		
SRIM_012670		DUF475 domain-containing protein
SRIM_029210	cvnA6	HAMP domain-containing protein
SRIM_022025		PAS domain-containing protein
SRIM_014215		protein kinase
<b>POHRANA I PROCESIRANJE INFORMACIJA (40,5%)</b>		
<b>Replikacija, rekombinacija i popravak (3,8%)</b>		
SRIM_022605	dnaX	DNA polymerase III subunit gamma and tau
SRIM_034195		L,D-transpeptidase
SRIM_019725		DEAD/DEAH box helicase
<b>Transkripcija (6,3%)</b>		
SRIM_009590	rbpA	RNA polymerase-binding protein RbpA
SRIM_030380		cold-shock protein
SRIM_033250		cold-shock protein
SRIM_030475	lexA	transcriptional repressor LexA
SRIM_024360	carD	CarD family transcriptional regulator
<b>Translacija, struktura ribosoma i biogeneza (30,4%)</b>		
SRIM_029570	rpsP	30S ribosomal protein S16
SRIM_018525	rplX	50S ribosomal protein L24
SRIM_018500	rplF	50S ribosomal protein L6
SRIM_018625	rpsG	30S ribosomal protein S7
SRIM_021265	rpsR	30S ribosomal protein S18
SRIM_018520	rplE	50S ribosomal protein L5
SRIM_029590	rplS	50S ribosomal protein L19
SRIM_018410	rplM	50S ribosomal protein L13
SRIM_018670	rplK	50S ribosomal protein L11
SRIM_018665	rplA	50S ribosomal protein L1
SRIM_018490	rpsE	30S ribosomal protein S5
SRIM_018555	rplV	50S ribosomal protein L22
SRIM_021120	rpmH	50S ribosomal protein L34
SRIM_018560	rpsS	30S ribosomal protein S19
SRIM_007465	infC	translation initiation factor IF-3
SRIM_013775	rplU	50S ribosomal protein L21
SRIM_018450	rpsM	30S ribosomal protein S13
SRIM_018405	rpsI	30S ribosomal protein S9
SRIM_018480	rplO	50S ribosomal protein L15
SRIM_018435	rplQ	50S ribosomal protein L17
SRIM_018495	rplR	50S ribosomal protein L18
SRIM_018565	rplB	50S ribosomal protein L2
SRIM_013605	rpsT	30S ribosomal protein S20
SRIM_018715	rpmG	50S ribosomal protein L33
<b>METABOLIZAM (35,4%)</b>		
<b>Transport i metabolizam aminokiselina (8,9%)</b>		
SRIM_029865	gabT	4-aminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase
SRIM_004235		aspartate aminotransferase family protein
SRIM_008715	ald	alanine dehydrogenase
SRIM_005060	yfbQ	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase
SRIM_007555	proV	glycine betaine/L-proline ABC transporter ATP-binding protein

SRIM_026635		APC family permease
SRIM_012710	tcmA	MFS transporter
<b>Transport i metabolizam ugljikohidrata (1,3%)</b>		
SRIM_028580	glgE	alpha-1,4-glucan--maltose-1-phosphate maltosyltransferase
<b>Transport i metabolizam koenzima (6,3%)</b>		
SRIM_003730	bioB	biotin synthase BioB
SRIM_009215	chlI	putative cobaltochelataze
SRIM_006640	coaBC	bifunctional phosphopantothenoylecysteine decarboxylase/phosphopantothenate--cysteine ligase CoaBC
SRIM_019420	hemC	hydroxymethylbilane synthase
SRIM_017135		hypothetical protein
<b>Proizvodnja i pretvorba energije (5%)</b>		
SRIM_019005		geranylgeranyl reductase family protein
<b>Transport i metabolizam anorganskih iona (3,8%)</b>		
SRIM_023945	pstA	phosphate ABC transporter permease PstA
SRIM_007095	metN	ATP-binding cassette domain-containing protein
SRIM_017155	cynT	carbonic anhydrase
<b>Transport i metabolizam lipida (2,5%)</b>		
SRIM_021220	ino1	inositol-3-phosphate synthase
SRIM_034880	hpnH	adenosyl-hopene transferase HpnH
<b>Biosinteza, katabolizam i transport sekundarnih metabolita (6,3%)</b>		
SRIM_023350		NAD(P)H:quinone oxidoreductase
SRIM_020350		acyl carrier protein
SRIM_003595		non-ribosomal peptide synthetase
SRIM_039620		type I polyketide synthase
SRIM_003610		non-ribosomal peptide synthetase
<b>Transport i metabolizam nukleotida (5,1%)</b>		
SRIM_027345	nrdB	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta
SRIM_019800	purF	amidophosphoribosyltransferase
SRIM_014065	desA	acyl-ACP desaturase
<b>PROTEINI NEPOZNATE FUNKCIJE (7,6%)</b>		
SRIM_028345		DUF3817 domain-containing protein
SRIM_015525		DUF4232 domain-containing protein
SRIM_016905		FmdB family transcriptional regulator
SRIM_006365		hypothetical protein
SRIM_010020		hypothetical protein
SRIM_023500		hypothetical protein

**Tablica P 3B.** Lista proteina raspodijeljenih u funkcionalne kategorije i podkategorije prema programu eggNOG čija je ekspresija značajno povećana u fazi SIII (u odnosu na fazu SI) na temelju analize "značajnost B"

Broj lokusa	Ime gena	Ime proteina na engleskom jeziku
<b>STANIČNI PROCESI I SIGNALIZACIJA (12,9%)</b>		
<b>Posttranslacijske modifikacije, izmjena proteina i šaperoni (1,98%)</b>		
SRIM_012830		pyroglutamyl peptidase
SRIM_009070		S8 family serine peptidase



<b>Kontrola staničnog ciklusa, stanična dioba, podjela kromosoma (0,99%)</b>		
SRIM_040750		M28 family peptidase
<b>Biogeneza staničnog zida/membrane/ovojnice (3,96%)</b>		
SRIM_015280	ina	M6 family metalloprotease domain-containing protein
SRIM_020280		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
SRIM_015910		peptidoglycan recognition protein
SRIM_001200		hypothetical protein
<b>Mehanizmi obrane (2,97%)</b>		
SRIM_032090		type 1 glutamine amidotransferase
SRIM_016290		ABC transporter ATP-binding protein
SRIM_003575		alpha/beta hydrolase
<b>Mehanizmi prijenosa signala (2,97%)</b>		
SRIM_012680		TerD family protein
SRIM_010365		TraR/DksA family transcriptional regulator
SRIM_021955		DUF1906 domain-containing protein
<b>POHRANA I PROCESIRANJE INFORMACIJA (4%)</b>		
<b>Replikacija, rekombinacija i popravak (0,99%)</b>		
SRIM_008725	nudF	NUDIX hydrolase
<b>Transkripcija (0,99%)</b>		
SRIM_040805		TetR family transcriptional regulator
<b>Translacija, struktura ribosoma i biogeneza (1,98%)</b>		
SRIM_001605		amidase
SRIM_004825		hypothetical protein
<b>METABOLIZAM (55,4%)</b>		
<b>Transport i metabolizam aminokiselina (7,92%)</b>		
SRIM_015325		4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
SRIM_040710		M1 family peptidase
SRIM_034695		M1 family metallopeptidase
SRIM_004300	speA	ornithine decarboxylase
SRIM_001220		NAD(P)-binding protein
SRIM_003390	ocd	2,3-diaminopropionate biosynthesis protein SbnB
SRIM_005745		asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)
SRIM_032505		thiamine pyrophosphate-requiring protein
<b>Transport i metabolizam ugljikohidrata (4,95%)</b>		
SRIM_016805		alpha-mannosidase
SRIM_039785		DUF4073 domain-containing protein
SRIM_004705		endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein
SRIM_031860		sugar ABC transporter substrate-binding protein
SRIM_014530		sugar phosphate isomerase/epimerase
<b>Transport i metabolizam koenzima (3,96%)</b>		
SRIM_021450	thiC	phosphomethylpyrimidine synthase ThiC
SRIM_029690	thiB	thiamine ABC transporter substrate-binding protein
SRIM_033790	phhB	4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehydratase
SRIM_015220	cysO	MoaD/ThiS family protein
<b>Proizvodnja i pretvorba energije (12,87%)</b>		
SRIM_012415		hypothetical protein
SRIM_009750	glpQ	glycerophosphodiester phosphodiesterase
SRIM_024905	citA	citrate synthase 2

SRIM_024290		aldo/keto reductase
SRIM_032525		LLM class F420-dependent oxidoreductase
SRIM_014130	xdhC	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein
SRIM_035205	gabD1	NADP-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase
SRIM_040675	sfnG	dimethyl sulfone monooxygenase SfnG
SRIM_014140	xdhA	xanthine dehydrogenase family protein molybdopterin-binding subunit
SRIM_014135	xdhB	xanthine dehydrogenase family protein subunit M
SRIM_007120	glpQ3	glycerophosphodiester phosphodiesterase
SRIM_035545		NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase
SRIM_040690	ssuD	LLM class flavin-dependent oxidoreductase
<b>Transport i metabolizam anorganskih iona (2,97%)</b>		
SRIM_010335	phoD	alkaline phosphatase
SRIM_004810	katE	catalase
SRIM_020390	phoA	alkaline phosphatase
<b>Transport i metabolizam lipida (1,98%)</b>		
SRIM_040685		SfnB family sulfur acquisition oxidoreductase
SRIM_034805	idi	isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase
<b>Biosinteza, katabolizam i transport sekundarnih metabolita (16,83%)</b>		
SRIM_032295		CocE/NonD family hydrolase
SRIM_038085	dapC	4-dedimethylamino-4-oxo-anhydrotetracycline transaminase OxyQ
SRIM_038115		tetracycline nonaketamide D-ring cyclase/dehydratase OxyK
SRIM_038075		hypothetical protein
SRIM_040820		SDR family oxidoreductase
SRIM_024375		PPOX class F420-dependent oxidoreductase
SRIM_032515		SDR family oxidoreductase
SRIM_038120		SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase
SRIM_038155		tetracycline polyketide synthase chain-length factor subunit OxyB
SRIM_035115		DUF427 domain-containing protein
SRIM_040830		amino acid adenylation domain-containing protein
SRIM_030990		amino acid adenylation domain-containing protein
SRIM_011250		DsbA family protein
SRIM_038070		methyltransferase
SRIM_038135		methyltransferase
SRIM_038080		PPOX class F420-dependent oxidoreductase
SRIM_038100		cyclase family protein
<b>Transport i metabolizam nukleotida (3,96%)</b>		
SRIM_024245		bifunctional metallophosphatase/5-nucleotidase
SRIM_013845	ndk	nucleoside-diphosphate kinase
SRIM_041550		hypothetical protein
SRIM_020360		ATP-grasp domain-containing protein
<b>PROTEINI NEPOZNATE FUNKCIJE (27,7%)</b>		
SRIM_030330		hypothetical protein
SRIM_008460		erythromycin esterase family protein
SRIM_005675		VOC family protein
SRIM_029625		DUF2469 domain-containing protein
SRIM_013135		hypothetical protein

SRIM_009170		glyoxalase
SRIM_039995		polyketide cyclase /reductase
SRIM_035225		calcineurin
SRIM_014545	ptp	aminopeptidase
SRIM_012870		NADP-dependent oxidoreductase
SRIM_009140		Asp23/Gls24 family envelope stress response protein
SRIM_002650		DUF3140 domain-containing protein
SRIM_014555		esterase-like activity of phytase family protein
SRIM_004420		NAD(P)H-dependent oxidoreductase
SRIM_036225		YjbQ family protein
SRIM_036015		PPOX class F420-dependent oxidoreductase
SRIM_034795		HdeD family acid-resistance protein
SRIM_004325		hypothetical protein
SRIM_031050		hypothetical protein
SRIM_011995		hypothetical protein
SRIM_014385		hypothetical protein
SRIM_041040		hypothetical protein
SRIM_033590		peptidase inhibitor family I36 protein
SRIM_039385		hypothetical protein
SRIM_004435		hypothetical protein
SRIM_041645		hypothetical protein
SRIM_007875		hypothetical protein
SRIM_016670		hypothetical protein

**Tablica P 4A.** Lista proteina raspodijeljenih u funkcionalne kategorije i podkategorije prema programu eggNOG čija je ekspresija značajno povećana u fazi S0 (u odnosu na fazu SI) na temelju analize ‘‘značajnost B’’.

Broj lokusa	Ime gena	Ime proteina na engleskom jeziku
<b>STANIČNI PROCESI I SIGNALIZACIJA (11,2%)</b>		
<b>Posttranslacijske modifikacije, izmjena proteina i šaperoni (3%)</b>		
SRIM_020130	dnaJ	molecular chaperone DnaJ
SRIM_020285	ftsH	AAA family ATPase
SRIM_030090		ATP-binding protein
<b>Kontrola staničnog ciklusa, stanična dioba, podjela kromosoma (1%)</b>		
SRIM_036295		GSCFA domain-containing protein
<b>Biogeneza staničnog zida/membrane/ovojnice (5%)</b>		
SRIM_015455	murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
SRIM_010705		RNA-binding protein
SRIM_020280		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
SRIM_025770	neuA	acylneuraminate cytidylyltransferase
SRIM_010430	murF	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase
<b>Mehanizmi obrane (2%)</b>		
SRIM_001095	femX	aminoacyltransferase
SRIM_014400		alpha/beta fold hydrolase
<b>POHRANA I PROCESIRANJE INFORMACIJA (39,8%)</b>		

<b>Replikacija, rekombinacija i popravak (10,1%)</b>		
SRIM_022605	dnaX	DNA polymerase III subunit gamma and tau
SRIM_036080		DUF3516 domain-containing protein
SRIM_019760	hrpA	ATP-dependent RNA helicase HrpA
SRIM_019725		DEAD/DEAH box helicase
SRIM_010305	dnaE	DNA polymerase III subunit alpha
SRIM_017690	recQ	DNA helicase RecQ
SRIM_019775	bldC	developmental transcriptional regulator BldC
SRIM_002665	rnhA	ribonuclease HI
SRIM_013035	dnaG	DNA primase
SRIM_029330	hup	HU family DNA-binding protein
<b>Transkripcija (5%)</b>		
SRIM_024360	carD	CarD family transcriptional regulator
SRIM_029310	ltbR	IcIR family transcriptional regulator NdgR
SRIM_009260	ectA	diaminobutyrate acetyltransferase
SRIM_030380		cold-shock protein
<b>Translacija, struktura ribosoma i biogeneza (24,2%)</b>		
SRIM_006780	rpsD	30S ribosomal protein S4
SRIM_029590	rplS	50S ribosomal protein L19
SRIM_018665	rplA	50S ribosomal protein L1
SRIM_018530	rplN	50S ribosomal protein L14
SRIM_018515	rpsN	type Z 30S ribosomal protein S14
SRIM_018460	infA	translation initiation factor IF-1
SRIM_018650	rplL	50S ribosomal protein L7/L12
SRIM_007460	rpmI	50S ribosomal protein L35
SRIM_018495	rplR	50S ribosomal protein L18
SRIM_018570	rplW	50S ribosomal protein L23
SRIM_018410	rplM	50S ribosomal protein L13
SRIM_018520	rplE	50S ribosomal protein L5
SRIM_018585	rpsJ	30S ribosomal protein S10
SRIM_018435	rplQ	50S ribosomal protein L17
SRIM_018505	rpsH	30S ribosomal protein S8
SRIM_018545	rplP	50S ribosomal protein L16
SRIM_018655	rplJ	50S ribosomal protein L10
SRIM_018535	rpsQ	30S ribosomal protein S17
SRIM_029570	rpsP	30S ribosomal protein S16
SRIM_018630	rpsL	30S ribosomal protein S12
SRIM_028895	mnmA	tRNA 2-thiouridine(34) synthase MnmA
SRIM_018525	rplX	50S ribosomal protein L24
SRIM_013605	rpsT	30S ribosomal protein S20
SRIM_013775	rplU	50S ribosomal protein L21
<b>METABOLIZAM (32,6%)</b>		
<b>Transport i metabolizam aminokiselina (5%)</b>		
SRIM_005060	yfbQ	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase
SRIM_006520		NAD(P)-binding protein
SRIM_009265	ectB	diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase
SRIM_009495	sufS	cysteine desulfurase
SRIM_026635		APC family permease
<b>Transport i metabolizam ugljikohidrata (6,1%)</b>		
SRIM_004705		endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein

SRIM_012655		HpcH/HpaI aldolase/citrate lyase family protein
SRIM_005825		SMP-30/gluconolactonase/LRE family protein
SRIM_009405		DUF839 domain-containing protein
SRIM_013025	xylB2	sugar kinase
<b>Transport i metabolizam koenzima (5%)</b>		
SRIM_019015	menG	demethylmenaquinone methyltransferase
SRIM_009210	cobQ	cobyric acid synthase
SRIM_019415	hemD	bifunctional uroporphyrinogen-III C-methyltransferase/uroporphyrinogen-III synthase
SRIM_023580	panC	pantoate--beta-alanine ligase
SRIM_019425	hemA	glutamyl-tRNA reductase
<b>Proizvodnja i pretvorba energije (5%)</b>		
SRIM_036405	namA	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase
SRIM_032865	aceB	malate synthase A
SRIM_010945	aceE	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type
SRIM_015895	fbiB	coenzyme F420-0:L-glutamate ligase
SRIM_012970	trxA	thioredoxin
<b>Transport i metabolizam lipida (1%)</b>		
SRIM_012795		NAD(P)-dependent oxidoreductase
<b>Biosinteza, katabolizam i transport sekundarnih metabolita (8,1%)</b>		
SRIM_010065		SDR family oxidoreductase
SRIM_025185		SDR family oxidoreductase
SRIM_020320		non-ribosomal peptide synthetase
SRIM_036300		non-ribosomal peptide synthase
SRIM_001135		dimodular nonribosomal peptide synthase
SRIM_003595		non-ribosomal peptide synthetase
SRIM_003615		NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein
SRIM_023135		non-ribosomal peptide synthetase
<b>Transport i metabolizam nukleotida (2%)</b>		
SRIM_009945	cpdB	bifunctional metallophosphatase/5-nucleotidase
SRIM_027350		ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha
<b>PROTEINI NEPOZNATE FUNKCIJE (17,3%)</b>		
SRIM_013135		hypothetical protein
SRIM_032720		PRC-barrel domain containing protein
SRIM_006365		hypothetical protein
SRIM_013765	obg	GTPase ObgE
SRIM_016710		hypothetical protein
SRIM_021440	ssgA1	SsgA family sporulation/cell division regulator
SRIM_039710		ester cyclase
SRIM_001405		DUF5133 domain-containing protein
SRIM_019045	mqnA	menaquinone biosynthesis protein
SRIM_011105	bldB	DUF397 domain-containing protein
SRIM_029870		ATP-binding protein
SRIM_041575		CGNR zinc finger domain-containing protein
SRIM_018660		hypothetical protein
SRIM_017140		hypothetical protein
SRIM_022155		hypothetical protein
SRIM_025900		hypothetical protein
SRIM_021200		hypothetical protein

**Tablica P 4B.** Lista proteina raspodijeljenih u funkcionalne kategorije i podkategorije prema programu eggNOG čija je ekspresija značajno povećana u fazi SI (u odnosu na fazu S0) na temelju analize ‘značajnost B’.

Broj lokusa	Ime gena	Ime proteina na engleskom jeziku
<b>STANIČNI PROCESI I SIGNALIZACIJA (21,6%)</b>		
<b>Posttranslacijske modifikacije, izmjena proteina i šaperoni (5,26%)</b>		
SRIM_016365		hypothetical protein
SRIM_032250		carbamoyltransferase
SRIM_009070		S8 family serine peptidase
SRIM_024285	hsp18	Hsp20/alpha crystallin family protein
SRIM_021780	sprI	PDZ domain-containing protein
SRIM_010330		thioredoxin domain-containing protein
SRIM_012830		pyroglutamyl peptidase
SRIM_040425		hypothetical protein
SRIM_033070		ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
<b>Kontrola staničnog ciklusa, stanična dioba, podjela kromosoma (1,17%)</b>		
SRIM_010385	sepF	cell division protein SepF
SRIM_040750		M28 family peptidase
<b>Biogeneza staničnog zida/membrane/ovojnice (8,77%)</b>		
SRIM_018875		outer membrane lipoprotein carrier protein LolA
SRIM_015910		peptidoglycan recognition protein
SRIM_029000	plc	phospholipase C, phosphocholine-specific
SRIM_035110		alkaline phosphatase
SRIM_031240		DNRLRE domain-containing protein
SRIM_014920		C40 family peptidase
SRIM_006910		hypothetical protein
SRIM_021230	pbp5	penicillin-binding protein
SRIM_014930		hypothetical protein
SRIM_018985		glycoside hydrolase
SRIM_015120	ponA	penicillin-binding protein
SRIM_013825	mrda	penicillin-binding protein 2
<b>Mehanizmi obrane (1,75%)</b>		
SRIM_032090		type 1 glutamine amidotransferase
SRIM_025175		beta-lactamase family protein
SRIM_019365		class A beta-lactamase
<b>Mehanizmi prijenosa signala (4,09%)</b>		
SRIM_035885		cyclic nucleotide-binding domain-containing protein
SRIM_027465	rsbW	anti-sigma regulatory factor
SRIM_004100	devR	response regulator transcription factor
SRIM_035890		cyclic nucleotide-binding domain-containing protein
SRIM_012485		universal stress protein
SRIM_021955		DUF1906 domain-containing protein
SRIM_021000	pknB;pksC	Stk1 family PASTA domain-containing Ser/Thr kinase
<b>POHRANA I PROCESIRANJE INFORMACIJA (4,09%)</b>		

<b>Transkripcija (1,17%)</b>		
SRIM_019510		MarR family transcriptional regulator
SRIM_003820		hypothetical protein
<b>Translacija, struktura ribosoma i biogeneza (2,92%)</b>		
SRIM_003970		DinB family protein
SRIM_001215		tRNA pseudouridine(13) synthase TruD
SRIM_004310		RidA family protein
SRIM_004825		hypothetical protein
<b>METABOLIZAM (43,86%)</b>		
<b>Transport i metabolizam aminokiselina (7,6%)</b>		
SRIM_038145		asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)
SRIM_038085	dapC	4-dedimethylamino-4-oxo-anhydrotetracycline transaminase OxyQ
SRIM_024020		VOC family protein
SRIM_004300	speA	ornithine decarboxylase
SRIM_010925	pepA	leucyl aminopeptidase
SRIM_006725	aroQ	type II 3-dehydroquinone dehydratase
SRIM_032520	fdh	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase
SRIM_040710		M1 family peptidase
SRIM_034695		M1 family metallopeptidase
SRIM_034135	iaaA	isoaspartyl peptidase/L-asparaginase
SRIM_039390		VOC family protein
SRIM_003400		PLP-dependent transferase
SRIM_008355		glyoxalase/bleomycin resistance/dioxygenase family protein
<b>Transport i metabolizam ugljikohidrata (4,68%)</b>		
SRIM_035550	tkt3	transketolase
SRIM_032220	gmhA	SIS domain-containing protein
SRIM_033425	mcl1	CoA ester lyase
SRIM_039785		DUF4073 domain-containing protein
SRIM_014565		haloacid dehalogenase
SRIM_024520	otsA	trehalose-6-phosphate synthase
SRIM_016830		sugar ABC transporter substrate-binding protein
SRIM_003840		glycine betaine/L-proline transporter ProP
<b>Transport i metabolizam koenzima (2,92%)</b>		
SRIM_020830	mobA	molybdenum cofactor guanylyltransferase
SRIM_032610	poxB2	pyruvate dehydrogenase
SRIM_032505		thiamine pyrophosphate-requiring protein
SRIM_001230		aspartate aminotransferase family protein
SRIM_016865	mog	MogA/MoaB family molybdenum cofactor biosynthesis protein
SRIM_038075		hypothetical protein
SRIM_010605	pdxB	2-hydroxyacid dehydrogenase
SRIM_038110		NAD(P)-binding protein
SRIM_001715		FAD-dependent monooxygenase
SRIM_020830	mobA	molybdenum cofactor guanylyltransferase
SRIM_001230		aspartate aminotransferase family protein
<b>Proizvodnja i pretvorba energije (8,19%)</b>		

SRIM_014130	xdhC	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein
SRIM_035545		NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase
SRIM_039235	aldA	aldehyde dehydrogenase family protein
SRIM_018960	nuoE	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoE
SRIM_039380	fgd_1	LLM class F420-dependent oxidoreductase
SRIM_018950	nuoG	NADH-quinone oxidoreductase subunit G
SRIM_032525		LLM class F420-dependent oxidoreductase
SRIM_035205	gabD1	NADP-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase
SRIM_004170	lldA	alpha-hydroxy-acid oxidizing protein
SRIM_007120	glpQ3	glycerophosphodiester phosphodiesterase
SRIM_009750	glpQ	glycerophosphodiester phosphodiesterase
SRIM_014135	xdhB	xanthine dehydrogenase family protein subunit M
SRIM_033435	ccrA2	crotonyl-CoA carboxylase/reductase
<b>Transport i metabolizam anorganskih iona (3,51%)</b>		
SRIM_004810	katE	catalase
SRIM_010575	bfr	bacterioferritin
SRIM_030245	dps	DNA starvation/stationary phase protection protein
SRIM_010335	phoD	alkaline phosphatase
SRIM_011495	phoD	alkaline phosphatase
SRIM_026955	mgtE	magnesium transporter
<b>Transport i metabolizam lipida (0,58%)</b>		
SRIM_038115		tetracycline nonaketamide D-ring cyclase/dehydratase OxyK
SRIM_038105		SDR family oxidoreductase
SRIM_031645	echA5	enoyl-CoA hydratase family protein
<b>Biosinteza, katabolizam i transport sekundarnih metabolita (15,79%)</b>		
SRIM_038130		AMP-binding protein
SRIM_038175		AfsR/SARP family transcriptional regulator
SRIM_038160		tetracycline polyketide synthase beta-ketoacyl synthase subunit OxyA
SRIM_038155		tetracycline polyketide synthase chain-length factor subunit OxyB
SRIM_038120		SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase
SRIM_023350		NAD(P)H:quinone oxidoreductase
SRIM_002895		SDR family oxidoreductase
SRIM_040820		SDR family oxidoreductase
SRIM_038150		acyl carrier protein
SRIM_007940		long-chain fatty acid--CoA ligase
SRIM_007505		3-oxoacyl-ACP reductase
SRIM_038125		nuclear transport factor 2 family protein
SRIM_038070		methyltransferase
SRIM_020320		non-ribosomal peptide synthetase
SRIM_011250		DsbA family protein
SRIM_027835		cytochrome P450
SRIM_017845		CehA/McbA family metallohydrolase
<b>Transport i metabolizam nukleotida (1,17%)</b>		
SRIM_016910	mntP	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase
SRIM_024245		bifunctional metallophosphatase/5-nucleotidase
<b>PROTEINI NEPOZNATE FUNKCIJE (30,4%)</b>		
SRIM_038080		PPOX class F420-dependent oxidoreductase



SRIM_038135		methyltransferase
SRIM_013715	rsfS	ribosome silencing factor
SRIM_038100		cyclase family protein
SRIM_032285		DUF2795 domain-containing protein
SRIM_032510		HAD family hydrolase
SRIM_029070		PRC and DUF2382 domain-containing protein
SRIM_019140		PLDc_N domain-containing protein
SRIM_002650		DUF3140 domain-containing protein
SRIM_007650	pup	ubiquitin-like protein Pup
SRIM_009155		hypothetical protein
SRIM_009140		Asp23/Gls24 family envelope stress response protein
SRIM_005995		antitoxin
SRIM_001265		SDR family oxidoreductase
SRIM_005675		VOC family protein
SRIM_012410		antibiotic biosynthesis monooxygenase
SRIM_014545	ptp	aminopeptidase
SRIM_039995		polyketide cyclase /reductase
SRIM_034410		oxidoreductase
SRIM_035225		calcineurin
SRIM_025825		DUF3140 domain-containing protein
SRIM_031905		peptidase M4
SRIM_035440		dodecin family protein
SRIM_041095		HD domain-containing protein
SRIM_025975		esterase family protein
SRIM_013135		hypothetical protein
SRIM_013130		hemerythrin domain-containing protein
SRIM_022345		LytR C-terminal domain-containing protein
SRIM_036650		VOC family protein
SRIM_029975		DUF503 domain-containing protein
SRIM_016670		hypothetical protein
SRIM_004800		VOC family protein
SRIM_004815		hypothetical protein
SRIM_039385		hypothetical protein
SRIM_003935		LppX_LprAFG lipoprotein
SRIM_004280		hypothetical protein
SRIM_004325		hypothetical protein
SRIM_027250		hypothetical protein
SRIM_004435		hypothetical protein
SRIM_016615		hypothetical protein
SRIM_014385		hypothetical protein
SRIM_025920		hypothetical protein
SRIM_003530		peptidase
SRIM_008605		hypothetical protein
SRIM_033590		peptidase inhibitor family I36 protein
SRIM_030100		hypothetical protein
SRIM_023080		hypothetical protein
SRIM_018660		hypothetical protein
SRIM_011455		hypothetical protein
SRIM_037425		hypothetical protein
SRIM_023855		hypothetical protein
SRIM_036195		hypothetical protein

SRIM_003845		hypothetical protein
SRIM_009545		hypothetical protein

**Tablica P 5.** Pregled proteina iz primarnog metabolizma i njihovih mjesta fosforilacije u sojevima G7 i 23383. Crvena slova predstavljaju mjesta fosforilacije.

Broj lokusa	Ime proteina na engl. jeziku	Mjesto fosforilacije	AA	G7	23383
SRIM_013960	ribose-5-phosphate isomerase	YET <b>T</b> GELPEIPAHHPQQG YET <b>T</b> GELPEIPAHHPQQG	T147 T148	+ +	+ +
SRIM_033090	4-carboxymuconolactone decarboxylase	LGAT <b>G</b> QTAIGAAAPK	T272	+	+
SRIM_029990	bifunctional riboflavin kinase/FAD synthetase	GTAGGGEPF <b>S</b> STLTR GTAGGGEPF <b>S</b> STLTR	S168 S169	+ +	+ +
SRIM_023100	dTMP kinase	AAEAAEAP <b>T</b> TETPMAGLER AAEAAEAP <b>T</b> TETPMAGLER DVPGASDE <b>T</b> AVLPPVRPEAR SQPSSASSDAEE <b>T</b> AVLPQHR GDSGTSGVER <b>T</b> R	T900 T901 T952 T936 T1015 S1007	+ + + + + +	+ + + + + -
SRIM_009610	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAAENIIP <b>T</b> TTGAAK AAAENIIP <b>T</b> TTGAAK	T209 T211	+ +	- +
SRIM_009560	transaldolase	ITSGNLAELIDQQHVVGVTN <b>P</b> SIFQK AISQGDGYD <b>T</b> QLTDLAAR	S47 T61	+ +	+ +
SRIM_028075	50S ribosomal protein L31	ILD <b>T</b> GGR	T54	+	+
SRIM_007455	50S ribosomal protein L20	EQV <b>T</b> HSLVYNYNDR EQV <b>T</b> HSLVYNYNDR ALP <b>S</b> DVNAPK	T40 S42 2119	+ - -	+ + +
SRIM_026575	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	AAEE <b>S</b> ITFSLPK	S324	+	+
SRIM_018645	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	NA <b>S</b> TANTNNGDSTAPLR NA <b>S</b> TANTNNGD <b>S</b> TAPLR	S8 T18	+ +	- +
SRIM_014495	citrate synthase	SDN <b>S</b> VVLR	S5	+	+

SRIM_003495	C-terminal binding protein	GALLVNTAR	T249	+	+
SRIM_004240	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	GALPVPQQVRPHPGVTGWPEGVPYLET	S131	+	+
		GGSSAAAR GALPVPQQVRPHPGVTGWPEGVPYLET GGSSAAAR	S132	-	+
SRIM_029570	30S ribosomal protein S16	KADEAEAESTSESTES	S146	+	+
SRIM_015305	VOC family protein	HSLADLGTEAS	S136 T8 T13	+	- + +
SRIM_018615	elongation factor Tu	EGGRTVGAGQVTK DEGGRHTPFNNYRPQFYFR	T386 T324	+	+
SRIM_018535	30S ribosomal protein S17	NVTETNEQR	T9	+	+
SRIM_023470	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine diphosphokinase	VDAADVTLSNPK	T25	+	+
		TSSDPTVQPVPTSVVERVDAADVTLSNPK	S14	-	+
		TSSDPTVQPVPTSVVERVDAADVTLSNPK	S13	-	+
		VDAADVTLSNPK	S27	-	+
SRIM_025945	phospho-sugar mutase	HLGAVAGVEVTASHNPPR HLGAVAGVEVTASHNPPR	S150 S148	+	+
SRIM_023050	anti-sigma factor antagonist BldG	VDFLDSTGLGVLVGGGLK VDFLDSTGLGVLVGGGLK	S57 T58	+	+
SRIM_028435	acetate kinase	VLVLNSGSSSVK VLVLNSGSSSVK VLVLNSGSSSVK VLVLNSGSSSVK	S15 S16 S17 S13	+	+
SRIM_006810	peptidylprolyl isomerase	KIAGAGSTPDPSTGNTAPNATVVINR KIAGAGSTPDPSTGNTAPNATVVINR	S250 T251 S255 T256	+	+
SRIM_029980	30S ribosome-binding factor RbfA	LGSHVTITDTR	S33	+	+
SRIM_028135	FOF1 ATP synthase subunit alpha	LLGEDAPVSTSK LLGEDAPVSTSK LLGEDAPVSTSK	S527 S529 T528	+	+
SRIM_028145	FOF1 ATP synthase subunit beta	TTTVETATATGR TTTVETATATGR APNFDQLESKTEMFETGVK APNFDQLESKTEMFETGVK APNFDQLESKTEMFETGVK	T2 T3 T145 T138 T140	+	- + + + +

SRIM_040360	cytochrome P450	AGEGADNTIGGR	T232	+	-
SRIM_004055	nitrite reductase small subunit NirD	MAEVLADTLTGAENGFTGADTSTK	T345	+	-
SRIM_018970	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	GMFGAAGGGDTSGYGGLVR	T32	+	-
SRIM_031925	uroporphyrinogen decarboxylase	SANDRPTGQQQTGTYS AFLK	T8	+	-
SRIM_025275	succinate--CoA ligase subunit alpha	TMGHAGAIVSGSSGTAQAK TMGHAGAIVSGSSGTAQAK TMGHAGAIVSGSSGTAQAK	T248 S257 S259	+	-
SRIM_023945	phosphate ABC transporter permease PstA	SNTVTPPRPVADSAPLPVSLK	S2	+	-
SRIM_007730	glycerol-3-phosphate dehydrogenase/oxidase	STLQSVPALGTHPADGSNPSR	S2	+	-
SRIM_028130	F0F1 ATP synthase subunit delta	MVAVVTS AVPLSDTQRQR EQLDALTDNTSVDAAK	T214 T23	+	-
SRIM_025905	aldehyde dehydrogenase family protein	TYKLYVGGK TYKLYVGGK	T10 Y14	+	-
SRIM_005065	LysE family translocator	AASVYLTLVPQFLTPGR AASVYLTLVPQFLTPGR AASVYLTLPQFLTPGR	T137 T144 Y135	+	-
SRIM_036415	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NVSLTSPLK	S405	+	-
SRIM_038670	elongation factor Tu	TDLTSLMR TDLTSLMR	T108 T107	+	-

SRIM_012540	heavy metal translocating P-type ATPase	FAATAG <b>Y</b> GV TGEVDGR	Y548	+	-
SRIM_010935	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase	AVSVTLPALGES <b>S</b> VTEGTVTRWLK AVSVTLPALGESV <b>T</b> EGTVTRWLK AVSVTLPALGESVTEG <b>T</b> VTRWLK	S13 S14 T17	+	-
SRIM_016865	MogA/MoaB family molybdenum cofactor biosynthesis protein	TASNRAAAGV <b>Y</b> ADK	Y12	+	-
SRIM_007705	HAD family phosphatase	MT <b>S</b> SIPAVGTR MT <b>S</b> SIPAVGTR	S3 S4	+	-
SRIM_021450	phosphomethylpyrimidine synthase ThiC	EFAA <b>S</b> GNR	SS583	+	-
SRIM_021105	decarboxylating 6-phosphogluconate dehydrogenase	GYAAD <b>S</b> GEGR	S235	+	-
SRIM_035545	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	AGERT <b>T</b> AHDTPEEPR AGERT <b>T</b> AHDTPEEPR	T450 T451	+	-
SRIM_014665	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	DGLQNESAVVP <b>T</b> EVK	T39	+	-
SRIM_014025	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	VADAGPVVIDN <b>S</b> SAWR VADAGPVVIDN <b>S</b> SAWR	S94 S93	+	-
SRIM_035205	NADP-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase	HAS <b>N</b> VPQTALYVEDLLR	S163	+	-
SRIM_005835	zinc-binding dehydrogenase	VLITGA <b>T</b> GGVGR	T143	+	-

SRIM_020330	2,3-diaminopropionate biosynthesis protein SbnB	TAASAALAADWL <b>T</b> RER	T137	+	-
SRIM_015325	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<b>T</b> QTTDHTTPTSAR TQTTDH <b>T</b> TPTSAR	T2 T8	+	-
SRIM_030485	vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	TETTS <b>G</b> PAR <b>S</b> R	S12	+	-
SRIM_028875	alpha/beta hydrolase	<b>M</b> TQQWRLDR <b>T</b> YR	T2	+	-
SRIM_023350	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	TQP <b>S</b> DRPESSTGPGDR TQP <b>S</b> DRPES <b>S</b> TGPGDR	S5 T12	+	-
SRIM_034815	CDP-alcohol phosphatidyltransferase family protein	M <b>S</b> TAILTGPPVAG <b>S</b> PLEAALR M <b>S</b> TAIL <b>T</b> GPPVAG <b>S</b> PLEAALR M <b>S</b> TAILTGPPVAG <b>S</b> PLEAALR M <b>S</b> TAILTGPPVAG <b>S</b> PLEAALR	S14 T7 S2 T3	+	-
SRIM_034255	glucose 1-dehydrogenase	MTQ <b>T</b> TGKEQRGT <b>D</b> GGR MTQ <b>T</b> TGKEQRGT <b>D</b> GGR	T4 T5	+	-
SRIM_039670	nitroreductase family deazaflavin-dependent oxidoreductase	EIPV <b>F</b> VLETP <b>E</b> T <b>S</b> HS EIPV <b>F</b> VLETP <b>E</b> T <b>S</b> HS	T146 S147	+	-
SRIM_020765	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2	LAKDLGIDLA <b>T</b> VTPTGPDGV <b>I</b> TR LAKDLGIDLATV <b>T</b> PTGPDGV <b>I</b> TR LAKDLGIDLATV <b>T</b> PTGPDGV <b>I</b> TR LAKDLGIDLATV <b>T</b> PTGPDGV <b>I</b> TR	T198 T200 T202 T209	+	-
SRIM_021265	30S ribosomal protein S18	ARRV <b>T</b> GNCTQH <b>R</b>	T48	-	+
SRIM_018405	30S ribosomal protein S9	<b>I</b> SGGGISGQAGALR ISGGG <b>I</b> SGQAGALR	S107 S112	-	+
SRIM_007465	translation initiation factor IF-3	NQA <b>H</b> T <b>V</b> IK	T110	-	+
SRIM_018515	type Z 30S ribosomal protein S14	GELPGV <b>T</b> K	T57	-	+
SRIM_018655	50S ribosomal protein L10	NSNA <b>A</b> VVTAY <b>T</b> GLSVAQLK	T29	-	+
SRIM_002075	AAA family ATPase	GGAAMADALAA <b>Y</b> VRDR	Y289	-	+
SRIM_021110	DNA polymerase III subunit beta	ALPNRPVE <b>I</b> STDG <b>V</b> R	S89	-	+
SRIM_021260	single-stranded DNA-binding protein	FTP <b>S</b> GAAVAK	S24	-	+
SRIM_041905	AAA family ATPase	MAEVLVERFR <b>S</b> CER	S11	-	+
SRIM_018440	DNA-directed RNA	R <b>T</b> LLSSIPGAAV <b>T</b> SIR RTLL <b>S</b> SIPGAAV <b>T</b> SIR	T41 S44	-	+

	polymerase subunit alpha	RTLLSSIPGAAVTSIR RTLLSSIPGAAVTSIR	S45 S53	- -	+ +
SRIM_025545	tryptophan--tRNA ligase	SAVTDTDTVIRYDAEAK SAVTDTDTVIRYDAEAK SAVTDTDTVIRYDAEAK	T229 T231 T233	- - -	+ + +
SRIM_011400	type I methionyl aminopeptidase	MSGQSLVPGKISPTR MSGQSLVPGKISPTR MSGQSLVPGKISPTR MSGQSLVPGKISPTR	S13 T15 S2 S5	- - - -	+ + + +
SRIM_003650	urease subunit alpha	TWQTAHVMMKK	T381	-	+
SRIM_029135	citramalate synthase	MLVSDMAGR	S340	-	+
SRIM_021350	alanine--glyoxylate aminotransferase family protein	VDAEGLDAAITR	T252	-	+
SRIM_032505	thiamine pyrophosphate-requiring protein	GDPEITAGVLK	T575	-	+
SRIM_034000	acetolactate synthase	YGQRAKYGEAR	Y491	-	+
SRIM_009935	pyruvate kinase	VTLQVTGVRGTEVHTK VTLQVTGVRGTEVHTK VTLQVTGVRGTEVHTK VTLQVTGVRGTEVHTK	T130 T139 T143 T134	- - - -	+ + + +
SRIM_020055	class II fructose-bisphosphate aldolase	FAYPAINVTSTQTLHAALR FAYPAINVTSTQTLHAALR FAYPAINVTSTQTLHAALR FAYPAINVTSTQTLHAALR	Y23 S30 T29 T31	- - - -	+ + + +
SRIM_002955	ABC transporter substrate-binding protein	MSVLQMSVGTMTGR	S359 S362 S364	- - -	+ + +
SRIM_014675	family 20 glycosylhydrolase	VAGGTITDTPR VAGGTITDTPR	T185 T187	- -	+ +
SRIM_038725	chitinase	LEISYTLPTTTR LEISYTLPTTTR LEISYTLPTTTR	T196 T197 T198	- - -	+ + +
SRIM_030685	HPr family phosphocarrier protein	AATASGVPVTIAK	S29	-	+
SRIM_014975	HAD family hydrolase	FIATNPDNTGPSPEGVLPATGSVAALIT K FIATNPDNTGPSPEGVLPATGSVAALIT K	S156 T153	- -	+ +
SRIM_016325	phosphopyruvate hydratase	AAVPSGASTGAFEAIELR	T43	-	+
SRIM_033310	inositol monophosphatase	TDTGDTTDETTGGASIHTADEVLR DTGSVDVSGVR	T16 T138	- -	+ +
SRIM_036830	aspartate aminotransferase family protein	HVTPNEPGELATLMAR	T173	-	+
SRIM_029725	aspartate aminotransferase family protein	GEGTNIYDDKGGK	Y46	-	+

SRIM_015815	adenosylhomocysteine aminotransferase	GVTEET <b>T</b> TGVHR GVTEET <b>T</b> TGVHR	T210 T211	- -	+ +
SRIM_010875	nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	PAG <b>S</b> TKDLVRDVLDGSSPAAILAR PAGSTKDLVRDVLDG <b>S</b> SPAAILAR PAGSTKDLVRDVLDGSS <b>P</b> AAAILAR PAG <b>S</b> TKDLVRDVLDGSSPAAILAR	S86 S98 S99 T87	- - - -	+ + + +
SRIM_006870	pyridoxal 5'-phosphate synthase lyase subunit PdxS	STTPNAT <b>S</b> ATAAAGTPETGTAR	S9	-	+
SRIM_000515	NAD(P)-binding protein	FADGRTAHGDLLIGADGFH <b>S</b> AIR FADGR <b>T</b> AHGDLLIGADGFHSAIR	S181 T167	- -	+ +
SRIM_035705	FAD-dependent oxidoreductase	QR <b>T</b> FDVPMDVWNVR	T179	-	+
SRIM_004135	respiratory nitrate reductase subunit gamma	STV <b>S</b> VWFR	S172	-	+
SRIM_018975	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	GLEEKLP <b>S</b> GFLLSTVEQAAGWVR GLEEKLP <b>S</b> GFLL <b>S</b> TVEQAAGWVR GLEEKLP <b>S</b> GFLL <b>S</b> TVEQAAGWVR	S9 S14 T15	- - -	+ + +
SRIM_014585	NAD-dependent malic enzyme	G <b>T</b> AFTAAERDR G <b>T</b> AFTAAERDR	T20 T23	- -	+ +
SRIM_023410	inorganic diphosphatase	YEV <b>D</b> HETGR	T23	-	+
SRIM_008035	formate dehydrogenase	QMQAQTPVEAA <b>S</b> ARVRR	S24	-	+
SRIM_008965	nitroreductase family protein	L <b>S</b> YAGRLGEEWLAALR L <b>S</b> YAGRLGEEWLAALR	S87 Y88	- -	+ +
SRIM_020820	potassium channel family protein	KL <b>P</b> THDAAAREVPEESSYR	T5	-	+
SRIM_023955	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS	LLASG <b>S</b> SAQK LLASG <b>S</b> SAQK	S63 S62	- -	+ +
SRIM_027900	diiron oxygenase	K <b>M</b> SEEQR	S78	-	+
SRIM_024270	RNA degradosome polyphosphate kinase	LEEAGCHVVYGLVGLK <b>T</b> HCK	T503	-	+
SRIM_014595	potassium-transporting ATPase subunit KdpB	IIVRIT <b>S</b> RPGR IIVRIT <b>S</b> RPGR	S238 T237	- -	+ +
SRIM_005615	DNA-binding protein	DQVEVGPRG <b>T</b> VTTFCIVNIK DQVEVGPRG <b>T</b> VTTFCIVNIK DQVEVGPRG <b>T</b> VTTFCIVNIK	T277 T279 T800	- - -	+ + +
SRIM_012115	3-alpha,7-alpha,12-alpha-trihydroxy-5-beta-cholest-24-enoyl-CoA hydratase	TVERHVREDQALL <b>Y</b> R	Y182	-	+



SRIM_005105	acetyl-CoA carboxylase	DGR <b>T</b> TAF <del>A</del> AAQC <del>G</del> TAVR	T325	-	+
SRIM_012185	acyl-CoA dehydrogenase	<b>T</b> TLLQQVAGR	T649	-	+
SRIM_034830	CDP-alcohol phosphatidyltransferase family protein	SGEHWAGRL <b>Y</b> MR	Y32	-	+
SRIM_004265	diacylglycerol kinase	GQR <b>S</b> AGLTRATGR GQRSAGL <b>T</b> RATGR	S358 T362	- -	+ +
SRIM_001240	acyl-CoA/acyl-ACP dehydrogenase	GEGNHLAS <b>A</b> MIPADTPGV <b>R</b>	S196	-	+
SRIM_007130	bifunctional metallophosphatase/5'-nucleotidase	AAVPLGKQTAS <b>F</b> TRTR AAVPLGKQ <b>T</b> AS <b>F</b> TRTR AAVPLGKQTAS <b>F</b> TR <b>T</b> R AAVPLGKQTAS <b>F</b> TR <b>T</b> R	S390 T388 T392 T394	- - - -	+ + + +
SRIM_018470	adenylate kinase	ANISQGTDLGK	S140	-	+
SRIM_010200	adenine phosphoribosyltransferase	LLEDVYAGAP <b>T</b> VK LLEDV <b>Y</b> AGAP <b>T</b> VK	T12 Y7	- -	+ +
SRIM_029670	UMP kinase	<b>L</b> SGEAFAGGGGLGVDPDVVHAIAR	S33	-	+
SRIM_032465	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	LLTDV <b>S</b> R LL <b>T</b> DV <b>S</b> R	S410 T407	- -	+ +
SRIM_003945	ABC transporter ATP-binding protein	ALTGGG <b>T</b> TVLLITHR ALTGGG <b>T</b> TVLLITHR ALTGGG <b>T</b> TVLLI <b>T</b> HR	T585 T586 T591	+ + -	+ + +
SRIM_006840	preprotein translocase subunit YajC	TEAADEAGT <b>G</b> TQAGK	T172	+	+
SRIM_022690	flavoheмоprotein	AVTGGPGAATAANTAFEGV <b>S</b> ALLEDL <b>S</b> ARRR	S481 S339	+ -	- +
SRIM_030020	WXG100 family type VII secretion target	ALDQAAQNYQ <b>S</b> TESK ALDQAAQNYQ <b>S</b> TESK	T87 S86	+ -	+ +
SRIM_006750	endolytic transglycosylase MltG	QQGGQHDPQGQGEQGEQVGQ <b>T</b> AQFE AVRPEQLR	T179	+	-
SRIM_020390	alkaline phosphatase	KPDYVTD <b>S</b> AASGS <del>G</del> WATG <b>H</b> K	S105	+	-
SRIM_004940	ABC transporter ATP-binding protein	TQFAEA <b>E</b> TSRER TQFAEA <b>E</b> TSRER	T622 S623	+ +	- -
SRIM_025805	ABC transporter permease	STELKPAARPGATAS <b>G</b> GGR	S16	+	-
SRIM_021150	AAA family ATPase	SESLGDDVSRE <b>T</b> PSPMDDTPIGR	T47	+	-
SRIM_007585	twin-arginine translocase subunit TatC	ANPDRELSDD <del>E</del> ASELDLTPEAITGSEPV <b>S</b> GSR	S294	+	-
SRIM_024130	sulfurtransferase	DLVDG <b>S</b> QVPNRPQTDYK	S127	+	-

SRIM_027135	mycoredoxin	ANGGNQTVPTVLFDPDGSTLTNP <b>S</b> LAQVK	S70	+	-
SRIM_018390	type I pantothenate kinase	AERT <b>P</b> YVDLTRAEWSALR AERT <b>P</b> YVDLTRAEWSALR	T19 Y21	+	-
SRIM_004810	catalase	AEDPA <b>S</b> GPMTTDQGVTVDHTDDSLQAGER	S19	+	-
SRIM_031215	(2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate synthase	KDLR <b>S</b> AATR KDLR <b>S</b> AATR	S544 T547	+	-
SRIM_026280	class IV adenylate cyclase	VMLNGLG <b>Y</b> TETLAFEK VMLNGLG <b>Y</b> TETLAFEK	Y101 T102	+	-
SRIM_032170	3'-5' exonuclease	ERAEDLPVQASSSG <b>GAS</b>	S256	+	-
SRIM_032940	transporter substrate-binding domain-containing protein	AAFGE <b>P</b> TRTDGK <b>T</b> PIVR AAFGE <b>P</b> TR <b>T</b> DGK <b>T</b> PIVR	T145 T141	+	-
SRIM_008415	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	DRLHDLDRQWLAC <b>S</b> PFCYVATSDAEGR	S48	+	-
SRIM_027005	alpha/beta hydrolase	<b>S</b> KPPTLTL <b>P</b> ACAR SKP <b>P</b> T <b>L</b> TL <b>P</b> ACAR SKP <b>P</b> T <b>L</b> TL <b>P</b> ACAR	S2 S6 S8	+	-
SRIM_016200	cytosine permease	SFSFPMFLLAVSLSA <b>S</b> WQLAIGPYVAD YSRYLPR SFSFPMFLLAVSLS <b>S</b> ASWQLAIGPYVAD YSRYLPR SFSFPMFLLAV <b>S</b> LSASWQLAIGPYVAD YSRYLPR <b>S</b> F <b>S</b> FP <b>M</b> FLLAVSLSASWQLAIGPYVAD YSRYLPR S <b>F</b> S <b>F</b> PMFLLAVSLSASWQLAIGPYVAD YSRYLPR	S204 S200 S202 S189 S191	+	-
SRIM_018400	phosphoglucosamine mutase	AGAEVVTIGTEPDGLNINDDCGSTHIAKLR AGAEVVTIGTEPDGLNINDDCGSTHIAKLR	S224 S225	+	-
SRIM_031745	aspartate aminotransferase family protein	ATGNYILGRLADM <b>R</b> T <b>R</b>	T318	+	-
SRIM_028935	NAD-dependent DNA ligase LigA		T161 T166 T168	-	+
SRIM_013780	ribonuclease E/G	<b>S</b> GQSVLVQVTK SGQ <b>S</b> VLVQVTK	S693 S696	-	+
SRIM_001215	tRNA pseudouridine(13) synthase TruD	<b>M</b> TGTLVLK	T2	-	+

SRIM_021690	serine--tRNA ligase	AADAEQDEAKEETQSSLLLR	T95	-	+
SRIM_007390	PLP-dependent aminotransferase family protein	LPSSRALVER LPSSRALVER	S29 S30	-	+
SRIM_010780	aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	PDELVFTPSGTQAVHSAMSGTLAAR PDELVFTPSGTQAVHSAMSGTLAAR	S78 T80 S68 T66 T70	- - - - -	+ + + + +
SRIM_031045	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	ALRYMDLAPGTPLR AAASVLKGR	Y325 S360	- -	+ +

**Tablica P 6.** Pregled proteina koji sudjeluju u staničnoj diobi i njihovih mjesta fosforilacije u sojevima G7 i 23383. Crvena slova predstavljaju mjesta fosforilacije.

Broj lokusa	Ime proteina na engl. jeziku	Mjesto fosforilacije	AA	G7	23383
SRIM_017755	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	TGGVRKPGAAGTTGEGAADGK RAAEDAPQGASEPSK TATPEAPAGATTGTTAPPGALPDSEQTK AVRPSGAAESDGERTSQFVALK APSADEAAGKPVDNATR ASASKPAADQPTTAIK TATPEAPAGATTGTTAPPGALPDSEQTK	T70 S219 S505  T391 T292 T372 T508	+ + +  + + - -	- - -  + + + +
SRIM_010385	cell division protein SepF	QQAQVPTTEPHPERDEPVR IAEGGFFNQS QQAQVPTTEPHPERDEPVRVTQPPAQR IAPVASITPDRPNLEK	T51 S206 T64 S90	+ + + -	- + - +
SRIM_030215	DNA translocase FtsK	AAPEPSGELPAR	S430	+	+
SRIM_023435	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	GAGQSGAGQSGAERSSSGPVPDFTK SSSGPVPDFTK AAPEPSGELPAR	S414 S416 S430	+ - +	- + -
SRIM_007590	Sec-independent protein translocase subunit TatA	TIQAAPGDVNSSRPVAEPNR DASADSSQAAPR	S81 S65	+ -	+ +
SRIM_010375	DivIVA domain-containing protein	QLENQADDSLAPPR	S282	+	+
SRIM_031465	cell division protein SepF	SGSEWPSWPDHR	S28	+	+

SRIM_015590	FHA domain-containing protein	YEPYGDGQ <b>T</b> HGGR	T332	+	+
SRIM_018315	FtsW/RodA/SpoVE family cell cycle protein	AADPDE <b>T</b> QATPR	T473	+	-
SRIM_005235	FHA domain-containing protein	DQVGAPGAGSVDP <b>S</b> V <b>S</b> GR	S94	+	-
SRIM_021195	SRIM_021195	GAHD <b>T</b> PAGQGPPTPQGQPHDPYVHDA YANDPYR	T16	+	-
SRIM_014230	FHA domain-containing protein	AADDDWPLPPPSAQAAPPPAQP <b>G</b> PQGG PVH <b>S</b> Q <b>G</b> GR	S419	+	-
SRIM_020980	FHA domain-containing protein	IYPDRDGQWIVEDL <b>G</b> ST <b>N</b> GTYLDR	T142	+	-
SRIM_010400	cell division protein FtsZ	E <b>E</b> PAPAP <b>S</b> RPAPQAEPR Q <b>Q</b> TVL <b>G</b> S <b>Q</b> NNGK Q <b>Q</b> <b>T</b> VL <b>G</b> S <b>Q</b> NNGK	S341 S327 T323	+	-
SRIM_028105	undecaprenyl/decaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase	<b>T</b> VQAAAVAAAAEESAAIGEAGERAS <b>Q</b> G APER TVQAAAVAAAAEESAAIGEAGERAS <b>Q</b> G APER	T393 S417	+	-
SRIM_020990	FtsW/RodA/SpoVE family cell cycle protein	RPAPAPAPSTDAEM <b>T</b> Q <b>V</b> VRP S <b>S</b> TT <b>T</b> TT <b>T</b> TVGTIGAPSR S <b>S</b> TT <b>T</b> TT <b>T</b> TVGTIGAPSR S <b>S</b> TT <b>T</b> TT <b>T</b> TVGTIGAPSR S <b>S</b> TT <b>T</b> TT <b>T</b> TVGTIGAPSR	T460 T7 T5 T6 T8	+	-
SRIM_019760	ATP-dependent RNA helicase HrpA	<b>T</b> TQIPKICLELGRGVR <b>T</b> TQIPKICLELGRGVR	T115 T116	+	-
SRIM_021285	replicative DNA helicase	AC <b>S</b> IKSNLPSVIFSLEMGR AC <b>S</b> IK <b>S</b> NLPSVIFSLEMGR	S276 S279	+	-
SRIM_008500	cell division protein SepF	YYDDDDYAEGSEPG <b>S</b> TGNTPWVTDPR YYDDDDYAEGSEPG <b>T</b> GNTPWVTDPR	S35 T36	+	-
SRIM_009805	ATP-dependent helicase	<b>P</b> SHPELMLFESWEELR	S296	-	+
SRIM_025775	N-acetylneuraminate synthase	VAGVVAEAE <b>S</b> ADREP <b>V</b> <b>S</b> <b>A</b>	S309	-	+

SRIM_029405	cell division initiation protein	AELLAMLEEVRSALPGSLAEAQELLGGR AELLAMLEEVRSALPGSLAEAQELLGGR	S42 S47	- -	+ +
SRIM_015925	LCP family protein	QNGDTRELPAQR	T87	+	-
SRIM_019170	sporulation protein	ASVEGGKAGSTPR	S289	-	+

**Tablica P 7.** Pregled svih kinaza/fosfataza (STY i His) i ostalih regulatornih proteina i njihovih mjesta fosforilacije u sojevima G7 i 23383. Crvena slova predstavljaju mjesta fosforilacije.

Broj lokusa	Ime proteina na engl. jeziku	Mjesto fosforilacije	AA	G7	23383
SRIM_014215	protein kinase	SLSGTSTR SLSTR	S125 S122	+ +	- +
SRIM_010555	Stk1 family PASTA domain-containing Ser/Thr kinase	AVAVQPPLPLEEPQPDGEPLHRTSR AVAVQPPLPLEEPQPDGEPLHRTSR EVPEGGSAAGSEDRTSVLPR EVPEGGSAAGSEDRTSVLPR EVPEGGSAAGSEDRTSVLPR	S390 T389 T936 S353 T357	+ + + + +	- - - - +
SRIM_007050	protein kinase	GAGAPSERSTPAR AANTPTPRPQAPR AANTPTPRPQAPR GAGAPSERSTPAR GAGAPSERSTPAR	T314 T349 T351 S310 S313	+ + + - -	+ + + + +
SRIM_017990	serine/threonine-protein kinase	QPVPQSPPPAQPPPPRPR LAGTSAPIGPGPRAGDS	S327 S441	+ +	- +
SRIM_019945	serine/threonine protein kinase	ALEAVTVGGGLTR	T141	-	+
SRIM_025105	serine/threonine protein kinase	TGELIGSIDYLAPER	T180	+	-
SRIM_020795	serine/threonine protein kinase	ALHGAQSTMTQTGMVMGTPQYLSPE QALGK ALHGAQSTMTQTGMVMGTPQYLSPE QALGK ALHGAQSTMTQTGMVMGTPQYLSPE QALGK ALHGAQSTMTQTGMVMGTPQYLSPE QALGK	S200 T205 T203 T201	+ + + +	- - - -
SRIM_015580	serine/threonine protein kinase	GAVPLVHGSAAPDSNREHTSMR	S352	+	-
SRIM_018190	serine/threonine protein kinase	ALLLDAANAPEDTGPEPPAPDATR	T287 T386	+ +	- -
SRIM_020800	protein kinase	AMQSGVTSMTQTGMVVGTPQYLSPE QALGR	T181	+	-
SRIM_002990	protein kinase	LGQGSYGQVYLARDR	S648	+	-
SRIM_021000	Stk1 family PASTA domain-containing Ser/Thr kinase	AMGDAGMTMTQTAAVIGTAQYLSPE QAK	T179	+	-

SRIM_021190	serine/threonine protein kinase	STAAVDVADT <b>S</b> GEQPLTAQAGQATN DGAEAESVTGTDK	S15	+	-
SRIM_020985	serine/threonine-protein phosphatase	LNDTPVVVGAVAENQHQLSDP <b>S</b> TLTP AAR	T272	+	+
		LNDTPVVVGAVAENQHQLSDP <b>S</b> TLQT PAAR	S271	+	+
SRIM_013710	histidine phosphatase family protein	LLEHNAGTLPEPVLGDD <b>T</b>	T217	+	-
SRIM_014315	sensor histidine kinase	DDVREET <b>T</b> QDDLPPVTER	T490	+	-
SRIM_021470	serine/threonine protein phosphatase	<b>T</b> DTLIDRPTVDLAAVPESAAPAEQHK TD <b>T</b> LIDRPTVDLAAVPESAAPAEQHK TDTLIDRPT <b>T</b> VDLAAVPESAAPAEQHK	T83 T85 T91	+	-
SRIM_027850	sensor histidine kinase	DVEAEIAER <b>T</b> AEQTIPQTDTDGAGAP GESHVVEEARD	T850	+	-
SRIM_004755	HAMP domain-containing histidine kinase	HGRPPVVL <b>T</b> VDGPVTVR	T350	+	-
SRIM_010620	sensor histidine kinase	AEAEIR <b>S</b> AAGGAAGR	S8	+	-
SRIM_034905	tyrosine-protein phosphatase	<b>T</b> QQTPEVPSTDSELAEVR	T2	+	-
SRIM_029210	HAMP domain-containing protein	AEENAS <b>T</b> GNHGVVDPHQER GAPAGANAGAGAGD <b>T</b> SQMPTVAPPT GAPR GPGD <b>T</b> GEFARPDFAFGTGAPQHGEQTT GEYALPADLR REPGAATGAASGG <b>T</b> SAGLSLNGAG ADDR GHEEPETGAFARPAAGGPGD <b>T</b> AEFAR PDFDAPPPAVGGTQGR YRAEENAS <b>T</b> GNHGVVDPHQER SESPQGGD <b>T</b> GQFARPEAGFGDR GPGDTGEFARPDFAFG <b>T</b> GAPQHGEQTT GEYALPADLR GPGDTGEFARPDFAFGTGAPQHGEQ <b>T</b> GEYALPADLR	S1231 T823 T941 T1130 T915 T1232 T982 T952 T962	+	-
SRIM_019790	DUF3073 domain-containing protein	YADLYNRDDDDDEDEGN <b>S</b> SQQR YNSGGTDLSR	S79 S21	+	-
SRIM_032285	DUF2795 domain-containing protein	SD <b>T</b> NPIELQK <b>S</b> DTNPIELQK DKISSIP <b>S</b> K	T4 S2 S47	+	+
SRIM_029625	DUF2469 domain-containing protein	SDLDLPG <b>S</b>	S102	+	+
SRIM_001820	STAS domain-containing protein	LEIID <b>S</b> FVAR	S62	+	+
SRIM_021045	DUF5324 family protein	QANPDWLVEPPAA <b>T</b> EVNER <b>T</b> TTLTAVDAAVLDPEVQAK <b>T</b> TTLTAVDAAVLDPEVQAK	T198 T204 T205	+	-

SRIM_001815	STAS domain-containing protein	QVLAVPLIGTLD <b>T</b> TR QVLAVPLIG <b>T</b> LD <b>T</b> TR QVLAVPLIGTLD <b>T</b> TR	T185 T182 T186	+	+
SRIM_024700	DUF3027 domain-containing protein	AGGSVEESGPGEEFG <b>H</b> S	S307	+	+
SRIM_013715	ribosome silencing factor	AAAHAEATAAEQDGEL <b>S</b>	S144	+	+
SRIM_014220	phosphatase	TPGASGEPVQPPQSPGAPLPTGPASSP EHQ <b>T</b> PAQGTR TPGASGEPVQPPQSPGAPLPTGPASSP EHQ <b>T</b> PAQGTR TPGASGEPVQPPQSPGAPLPTGPASSP EHQ <b>T</b> PAQGTR TPGASGEPVQPPQSPGAPL <b>T</b> GPASSP EHQ <b>T</b> PAQGTR	T284 S278 S279 S274	+	+
SRIM_004440	DUF2795 domain-containing protein	AEEDHELEPSGEDQPAVD <b>R</b> TAGGPAP GSTPDGLTPEAVAIR	T51	+	+
SRIM_030205	HAMP domain-containing protein	NIAMVTTAIKGD <b>L</b> TK NTINTMVDQL <b>S</b> AFAEQVTRVAR	T979 S637	+	-
SRIM_003375	aminoglycoside phosphotransferase family protein	<b>S</b> PGQTTPGPHPVDDGLVR	S2	+	-
SRIM_029960	transcription termination/antitermination protein NusA	EFDDT <b>P</b> S <b>G</b> FG <b>R</b>	S80	+	-
SRIM_004540	HAMP domain-containing histidine kinase	<b>M</b> TEQAVPPGHEG <b>R</b> TGR MTEQAVPPGHEG <b>R</b> <b>T</b> GR	T2 T14	-	+
SRIM_038915	nitronate monooxygenase	GED <b>T</b> VRTAVFGPEWPDFNPMRVQR GED <b>T</b> VRT <b>A</b> VFGPEWPDFNPMRVQR	T223 T226	-	+
SRIM_012635	two-component sensor histidine kinase	LD <b>Y</b> RLAR	Y273	-	+
SRIM_028940	bifunctional diguanylate cyclase phosphodiesterase	ALDAGDVELH <b>Y</b> QPK	Y442	-	+
SRIM_024190	HAMP domain-containing histidine kinase	LTEQVDE <b>T</b> LKR	T71	-	+

**Tablica P 8.** Pregled proteina nepoznate funkcije i njihovih mjesta fosforilacije u sojevima G7 i 23383. Crvena slova predstavljaju mjesta fosforilacije.

Broj lokusa	Ime proteina na engl. jeziku	Mjesto fosforilacije	AA	G7	23383
SRIM_016615	hypothetical protein	SAEEVNADQP <b>S</b> VR	S40	+	+
SRIM_027495	hypothetical protein	EQAQ <b>S</b> ALNQGK	S14	+	+
SRIM_016410	hypothetical protein	<b>S</b> GQTAGGASGVSGAASVR DRVPDGA <b>T</b> PWSGTDVR SGQTAGGASGV <b>S</b> GAASVR SVGLPETVFAPPLAGFDEQD <b>T</b> PPPSTRPEAK SGQTAGGASGVSGAASVR SGQ <b>T</b> AGGASGVSGAASVR ADEGGDDR <b>S</b> VGLPETVFAPPLAGFDEQD TPPPSTRPEAK	S129 T178 S140 T215  S137 T132 S195	+	+
SRIM_010030	hypothetical protein	<b>M</b> TARAFTAPLR	T71	+	+
SRIM_024965	hypothetical protein	SGPAGAAPAAGNIPDA <b>T</b> APLPR	T347	+	+
SRIM_023405	threonine/serine exporter family protein	TESPAEPEGSFAFSPGGTATGNGST <b>T</b> GQH QLPDR TESPAEPEGSFAFSPGGTATGNG <b>S</b> TTGQH QLPDR TESPAEPEGSFAFSPGGTA <b>T</b> GNGSTTGQH QLPDR TESPAEPEGSFAFSPGGTATGNG <b>S</b> TTGQH QLPDR	T109 S107 T103 T108	+	-
SRIM_026815	hypothetical protein	GSGDHISD <b>T</b> LVGGIPAVPADAAAPSGPS FPSGPGAGQDTPAPPRPK GGAAYP <b>S</b> G <b>T</b> PPYGT EADDAADAAAKPEEPK <b>T</b> ETTLTR GSGDHISD <b>T</b> LVGGIPAVPADAAAPSGPS FPSGPGAGQDTPAPPRPK GSGDHISD <b>T</b> LVGGIPAVPADAAAPSGPS FPSGPGAGQDTPAPPRPK G <b>S</b> GDHISD <b>T</b> LVGGIPAVPADAAAPSGPS FPSGPGAGQDTPAPPRPK EADDAADAAAKPEEPK <b>T</b> ETTLTR EADDAADAAAKPEEPK <b>T</b> ETTLTR EADDAADAAAKPEEPK <b>T</b> ETTL <b>T</b> TR	T348 T24 T50 S346  S345 S340  T52 T53 T55	+	+
SRIM_031615	hypothetical protein	PM <b>T</b> LGEDWRVMQYR	T71	+	+
SRIM_023855	hypothetical protein	SLSDGGGYGGEPGGPD <b>T</b> GGQTR LPDGGGD <b>T</b> YGSGRR LPDGGGD <b>T</b> YG <b>S</b> GRR LLASG <b>S</b> SAQK	T18 T33 S36 S62	+	-
SRIM_019835	Lsr2 family protein	VYEAFDAAN <b>S</b>	S106	+	-



SRIM_025665	hypothetical protein	ADASAPVAAPAGGAD <b>T</b> AELGTVR	T84	+	-
SRIM_039000	HAD family hydrolase	MV <b>T</b> TSPQQGPFALSHGATAHR MVT <b>T</b> SPPQQGPFALSHGATAHR	T3 T4	+	-
SRIM_004815	hypothetical protein	EGD <b>T</b> FSTNLEEQQNAAGHPK EGDTF <b>S</b> TNLEEQQNAAGHPK EGDTF <b>S</b> TNLEEQQNAAGHPK	T42 S44 T45	+	-
SRIM_021080	DUF3566 domain-containing protein	GSAT <b>S</b> GGSSSEDSYQGGTVTDTR <b>S</b> GAGQGAGAQQGVR	T35 S91	+	-
SRIM_014620	hypothetical protein	AGD <b>T</b> GTGTRPDGGTDTGSGHPSAASDR AGDTGTGTRPDGG <b>T</b> DTGSGHPSAASDR NALQQPLDHQAAEGTPGYGQEQQPDH <b>T</b> AQGMLGDEAQQR	T370 T380 T1730	+	-
SRIM_006765	hypothetical protein	RAFWF <b>T</b> TGAAAGVWATTK	T9	+	-
SRIM_007840	DUF3090 domain-containing protein	SGGNAPVPAVAPAEPADTAPLE <b>S</b> PVEEEF R	S87	+	-
SRIM_011000	DUF4191 domain-containing protein	AKAD <b>S</b> AEGAANSRLK	S9	+	-
SRIM_028800	enhanced serine sensitivity protein SseB	DAYAAGPAPAQAPAPAYGY <b>G</b> YPRPY DAYAAGPAPAQAPAPAY <b>G</b> YGYPRPY <b>S</b> AGAHQGAAGQVEQMLQQVSPGR	Y262 Y260 S2	+	-
SRIM_041300	hypothetical protein	AAAT <b>T</b> TRK AAAT <b>T</b> TRK	S230 S231	+	-
SRIM_024125	DUF1416 domain-containing protein	LLDSTGEFTAIEVPTS <b>A</b> TGQFR ALVPGAT <b>A</b> DRTVVAR ALVPGATADRT <b>V</b> VAR	T54 T76 T80	+	-
SRIM_016345	hypothetical protein	RWQEGHSG <b>S</b> FGGG	S102	+	-
SRIM_003100	hypothetical protein	PTAPEPVAPAP <b>T</b> TPDAWR P <b>T</b> APEPVAPAP <b>T</b> TPDAWR	T19 T9	+	-
SRIM_041150	hypothetical protein	QACRIDMPL <b>S</b> FADDFDAVR	S330	+	-
SRIM_021445	YibE/F family protein	DTGRRF <b>E</b> SIVTPDATR DT <b>T</b> GRRFESIVTPDATR	S155 T149	+	-

SRIM_018745	YajQ family cyclic di-GMP-binding protein	ALDAGEPEAS <b>S</b> GK	S87	+	-
SRIM_004435	hypothetical protein	<b>S</b> DESMGDEVYQPTASDK SDE <b>S</b> MGDEVYQPTASDK	S2 S576	+	-
SRIM_037305	hypothetical protein	MTSSNTTSDAHP <b>Y</b> LRAATAGIR MTSSNTTSDAHPYLRAA <b>T</b> AGIR	Y18 T13	+	-
SRIM_039385	hypothetical protein	SPDEGDDEEEHTDVPD <b>T</b> DVSG <b>T</b> GRR SPDEGDDEEEHTDVPD <b>T</b> DV <b>S</b> GTGR	T58 S56	+	-
SRIM_032155	hypothetical protein	<b>S</b> IEMNILHMR	S137	+	-
SRIM_021335	hypothetical protein	ELGDMARAH <b>A</b> YFVRAAER	Y92	+	-
SRIM_025340	DUF2690 domain-containing protein	<b>S</b> GTGAHG <b>P</b> VEGARLAAALR SG <b>T</b> GAHG <b>P</b> VEGARLAAALR	S2 T4	+	-
SRIM_019160	hypothetical protein	ELRAD <b>Y</b> AAAGQ	Y169	+	-
SRIM_026585	hypothetical protein	ASGQAPDPV <b>S</b> GR	S186	+	-
SRIM_022155	hypothetical protein	ANYQQNPANGNQDPAG <b>S</b> TQMFR ANYQQNPANGNQDPAG <b>S</b> TQMFR	T19 S18	+	-
SRIM_014615	hypothetical protein	QHVPNPQGS <b>S</b> AR	S142	+	-
SRIM_017540	hypothetical protein	STPAMDAN <b>S</b> FLMAGGAKSAR STPAMDAN <b>S</b> FLMAGGAK <b>S</b> AR	S10 S19	-	+
SRIM_005420	hypothetical protein	AVADALGVQLLY <b>T</b> TGLFDTTALAEFPLV IR AVADALGVQLLY <b>T</b> TGLFDTTALAEFPLV IR AVADALGVQLLYTTGLFD <b>T</b> TALAEFPLV IR AVADALGVQLLYTTGLFD <b>T</b> TALAEFPLV IR	T1483 T1484 T1489 T1490	-	+
SRIM_006680	hypothetical protein	<b>T</b> SSIIQLAAEQK <b>T</b> SSIIQLAAEQK	S3 S4	-	+
SRIM_031110	hypothetical protein	MTFMDYGV <b>S</b> TLRR	T10	-	+
SRIM_035400	hypothetical protein	RIAAVAE <b>S</b> LRAYEPAK RIAAVAE <b>S</b> LRA <b>Y</b> EPAK	S548 Y552	-	+
SRIM_013120	hypothetical protein	AGYLVGPYD <b>T</b> FANGQDPK AG <b>Y</b> LVGPYDTFANGQDPK	T336 Y329	-	+
SRIM_008270	hypothetical protein	<b>T</b> SRGARVSLFAPLR TSRGARV <b>S</b> LFAPLR <b>T</b> SRGARVSLFAPLR	S64 S70 T63	-	+
SRIM_013790	hypothetical protein	ALGAARE <b>S</b> VRR	S324	-	+

SRIM_027250	hypothetical protein	AAGEAP <b>S</b> AR	S28	-	+
SRIM_041605	hypothetical protein	GNPLQLTETM <b>R</b> SRR GNPLQL <b>T</b> ETMRSRR	S13 T8	- -	+ +
SRIM_005045	hypothetical protein	<b>T</b> VHPRLFGIRAGK	T110	-	+
SRIM_023975	hypothetical protein	N <b>T</b> DPKTVQDR NTDPK <b>T</b> VQDR SEGE <b>G</b> AIGP <b>S</b> DAK TVQDR <b>V</b> SKEAK PLL <b>L</b> TEFGVGSETVPTEAFR	T55 T59 S168 S65	- - - -	+ + + +
SRIM_025755	hypothetical protein	PLL <b>L</b> TEFGVGSETVPTEAFR	T182 T190 T193	- - -	+ + +
SRIM_032570	hypothetical protein	S <b>M</b> TFNALIQNGQESYV <b>A</b> SR	T140	-	+
SRIM_037320	hypothetical protein	GP <b>D</b> TGAGP <b>V</b> AR	T67	-	+
SRIM_041390	hypothetical protein	AEAERELL <b>T</b> EFFARR	T81	-	+
SRIM_031725	hypothetical protein	M <b>R</b> TTVGQAAPYDRK	T3	-	+
SRIM_039280	hypothetical protein	AICA <b>S</b> TPAKTGTKR AICA <b>T</b> PAKTGTKR	S87 T88	- -	+ +
SRIM_041680	hypothetical protein	NAATVYI <b>Q</b> QL <b>S</b> RGARR	S161	-	+
SRIM_034900	hypothetical protein	SLSERL <b>T</b> YRR	T106	-	+
SRIM_026075	hypothetical protein	S <b>N</b> DE <b>T</b> SRFVR	T6	-	+
SRIM_016670	hypothetical protein	QQVADAEQDARD <b>T</b> FKG	T61	-	+
SRIM_037950	hypothetical protein	PGDGR <b>T</b> GVAAAGAGTDRGR PGDGR <b>T</b> GVAAAGAG <b>T</b> DRGR	T212 T221	- -	+ +
SRIM_041470	hypothetical protein	TAWDISAAVR <b>T</b> ETR TAWDISAAVR <b>T</b> ETR TAWDISAAVR <b>T</b> ETR <b>T</b> AWDISAAVR <b>T</b> ETR	T61 T63 S56 T51	- - - -	+ + + +
SRIM_031330	hypothetical protein	EIAE <b>Y</b> AKIRR	Y119	-	+
SRIM_036260	hypothetical protein	ALP <b>V</b> VDSVAIPTARGAER	Y297	-	+
SRIM_011925	hypothetical protein	MML <b>T</b> TAPTTR MML <b>T</b> TAPTTR MSDL <b>S</b> DGKTK MSDL <b>S</b> DGK <b>T</b> K	T149 T150 S6 T10	- - - -	+ + + +
SRIM_019780	hypothetical protein	SLADLLPTPPVPV <b>V</b> H <b>S</b> R	S68	-	+
SRIM_000370	hypothetical protein	L <b>N</b> G <b>T</b> GPALR	T104	-	+
SRIM_010020	hypothetical protein	MDADIAAG <b>T</b> K	T98	-	+

SRIM_014210	hypothetical protein	TL <b>T</b> EARQAR	T290	-	+
SRIM_041385	hypothetical protein	MSTRTRDL <b>T</b> AQK	T9	-	+
SRIM_027635	PAS domain-containing protein	SLEPL <b>S</b> PELRETYFEQNGTR SLEPL <b>S</b> PELRE <b>T</b> YFEQNGTR	S170 S176	- -	+ +
SRIM_035570	hypothetical protein	<b>S</b> PARNP <b>A</b> R	S51	-	+
SRIM_028415	hypothetical protein	<b>A</b> SGPMR <b>P</b> SR <b>R</b> ASGPMR <b>P</b> SR <b>R</b>	S394 S400	- -	+ +
SRIM_015090	DUF445 domain-containing protein	DSDVQAVVGEA <b>I</b> TRR	T210	-	+
SRIM_035100	hypothetical protein	<b>T</b> SILD <b>T</b> R	S170	-	+
SRIM_020975	DUF3662 domain-containing protein	LEGLVNG <b>T</b> FAK	T18	-	+
SRIM_015760	hypothetical protein	QGVIA <b>S</b> MRR	S339	-	+
SRIM_010465	DUF58 domain-containing protein	STAR <b>Y</b> GELMVRR	Y235	-	+
SRIM_005685	acylase	ALNTAVPGLATALADAV <b>S</b> ELR ALNTAVPGLA <b>T</b> ALADAVSEL <b>R</b>	S675 S668	- -	+ +
SRIM_016550	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein	<b>T</b> TDRVFALLGDATLRMLPR <b>T</b> TDRVFALLGDATLRMLPR TTDRVFALLGDAT <b>L</b> LRMLPR	T481 T482 T493	- - -	+ + +
SRIM_025800	ABC transporter permease	<b>T</b> RFGFDLRAVGASEPAAEASGVSVK TRFGFDLRAVGASE <b>P</b> EAAEASGVSVK TRFGFDLRAVGASEPAAEAS <b>G</b> SVSVK TRFGFDLRAVGASEPAAEASGV <b>S</b> VK	T218 S230 S237 S240	- - - -	+ + + +
SRIM_030660	insulinase family protein	L <b>A</b> T <b>A</b> AGR	T374	-	+
SRIM_004015	DUF1684 domain-containing protein	EIEAWPWPDAVAVKAE <b>Y</b> R	Y143	-	+
SRIM_004795	class I SAM-dependent methyltransferase	<b>Y</b> AIDREER	Y22	-	+
SRIM_011090	GNAT family N-acetyltransferase	TERLY <b>S</b> DGEFDLTALAALR <b>T</b> ERLYSDGEFDLTALAALR	S95 T90	- -	+ +
SRIM_030220	DUF4115 domain-containing protein	PTTVPGPGAS <b>E</b> SAVAGV <b>P</b> K PTTVPGPGASESAVAGV <b>P</b> K PTTVPGPGASESAVAGV <b>P</b> K	S177 S169 S170	- - -	+ + +

SRIM_029070	PRC and DUF2382 domain-containing protein	ISDEERR <b>T</b> GR KES <b>V</b> PVER TES <b>R</b> PLAGAGAGAMSR NAPLGENPQEL <b>T</b> GK PGTAP <b>S</b> GTVPGR	T233 S261 S150 T13 S112	- - - - -	+ + + + +
SRIM_030760	DUF4193 domain-containing protein	KTDDDLNED <b>S</b> IEELK	S19	-	+
SRIM_022855	DUF4365 domain-containing protein	AAEAT <b>S</b> WQKEQVSR AAEATSWQKEQ <b>V</b> SR	S7 S14	- -	+ +
SRIM_006010	VOC family protein	RMADRGIT <b>M</b> IDEIQGPPR	T242	-	+
SRIM_025050	Uma2 family endonuclease	TYVR <b>T</b> GIHRNR	T153	-	+
SRIM_033380	tyrosinase family protein	<b>P</b> YTERYLGR PYTER <b>Y</b> LGR	Y31 Y35	- -	+ +
SRIM_008130	DUF1343 domain-containing protein	VAGRPAELE <b>T</b> VPMK	T250	-	+
SRIM_012690	DUF3052 domain-containing protein	SATADHAEER <b>T</b> NPAIK	T12	-	+
SRIM_014155	DUF397 domain-containing protein	MNV <b>T</b> GVTRK	T4	-	+
SRIM_023620	Lsr2 family protein	ARASSGGSQD <b>T</b> AKIR	T77	-	+
SRIM_026450	Lsr2 family protein	SGSASGSGET <b>T</b> AKIR	T80	-	+
SRIM_015490	methyltransferase	TLIKNRAS <b>L</b> SHK TLIKNRAS <b>L</b> SHK <b>T</b> LIKNRASLSHK	S12 S14 T5	- - -	+ + +
SRIM_024195	DUF2993 domain-containing protein	DTGD <b>T</b> AQFEK	T37	-	+
SRIM_005555	DUF2637 domain-containing protein	ALAGEAT <b>S</b> PR	S155	-	+
SRIM_002490	type III effector protein	EQLAGWET <b>T</b> GLIETAR	T74	-	+
SRIM_021140	single-stranded DNA-binding protein	TDTPAAEGTD <b>T</b> LTR AAVSIISDS <b>T</b> SRDLQK	T13 T59 S58 S56	- - - -	+ + + +
SRIM_003935	LppX_LprAF G lipoprotein	AAV <b>T</b> TTLK	T244	-	+

SRIM_022025	PAS domain-containing protein	AFNVR <b>T</b> LGQGVFSSQIADQQRPAAPGA PAAGSGR SQNPQHPPQHLLNS <b>S</b> SEGR SQNPQHPPQHLLNS <b>S</b> SEGR	T1050 S1148 S1149	+ + +	- - -
SRIM_001300	STAS domain-containing protein	<b>Y</b> ADVDDAR	Y101	+	-
SRIM_030035	hypothetical protein	DQNGGQRPDYLVVEDEETW <b>T</b> TQR	T539	+	-
SRIM_020050	DUF3151 domain-containing protein	DSSPTAAD <b>T</b> LS	S137	+	+
SRIM_000380	hypothetical protein	M <b>A</b> T <b>T</b> IQVLR M <b>A</b> T <b>T</b> IQVLR	T3 T4	+ +	- -

**Tablica P 9.** Popis fosforiliranih proteina bakterije *S. rimosus* čiji ortolozi nisu pronađeni u bazi dbPSP. Proteini označeni crnim slovima su pronađeni samo u soju 23383, proteini označeni tamno-sivim slovima samo u soju G7, a proteini označeni podebljanim slovima su pronađeni kod oba soja.

Broj lokusa	Ime gena	Ime proteina na engleskom jeziku
<b>STANIČNI PROCESI I SIGNALIZACIJA</b>		
<b>Posttranslacijske modifikacije, izmjena proteina i šaperoni</b>		
SRIM_011555		methyltransferase domain-containing protein
SRIM_007640	prcA	proteasome subunit alpha
SRIM_032250		carbonyltransferase
<b>SRIM_014925</b>		<b>peptidase</b>
<b>Unutarstanični promet, izlučivanje i transport vezikula</b>		
SRIM_035100		hypothetical protein
SRIM_035040		amidohydrolase family protein
SRIM_028210		ATP-binding protein
<b>Biogeneza staničnog zida/membrane/ovojnice</b>		
SRIM_001465		penicillin-binding protein
SRIM_008325		glycosyltransferase family 2 protein
SRIM_028415		hypothetical protein
<b>Mehanizmi obrane</b>		
SRIM_018890		ATP-grasp domain-containing protein
<b>Mehanizmi prijenosa signala</b>		
<b>SRIM_014225</b>		<b>VWA domain-containing protein</b>
SRIM_021470		serine/threonine protein phosphatase
SRIM_041150		hypothetical protein
SRIM_010620		sensor histidine kinase
<b>POHRANA I PROCESIRANJE INFORMACIJA</b>		
<b>Replikacija, rekombinacija i popravak</b>		

SRIM_022915	pksB_1	MBL fold metallo-hydrolase
SRIM_036935		ISAZo13 family transposase
SRIM_002075	helD	AAA family ATPase
SRIM_017540		hypothetical protein
SRIM_005420		hypothetical protein
SRIM_041905		AAA family ATPase
SRIM_028935	ligA	NAD-dependent DNA ligase LigA
SRIM_008415		pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein
<b>Transkripcija</b>		
SRIM_004740		nuclear transport factor 2 family protein
SRIM_016965		MerR family transcriptional regulator
SRIM_034425		FUSC family protein
SRIM_038590		helix-turn-helix transcriptional regulator
SRIM_032495		plasmid stabilization protein
SRIM_021225		PadR family transcriptional regulator
SRIM_039240		GAF domain-containing protein
<b>Translacija, struktura ribosoma i biogeneza</b>		
SRIM_010465		DUF58 domain-containing protein
SRIM_013780	rne	ribonuclease E/G
SRIM_001215		tRNA pseudouridine(13) synthase TruD
SRIM_021690	serS	serine--tRNA ligase
SRIM_022135		ATP-grasp ribosomal peptide maturase
<b>Procesiranje i modifikacija RNA</b>		
SRIM_015760		hypothetical protein
<b>METABOLIZAM</b>		
<b>Transport i metabolizam aminokiselina</b>		
SRIM_009615		zinc carboxypeptidase
SRIM_006680		hypothetical protein
SRIM_005065		LysE family translocator
SRIM_020330		2,3-diaminopropionate biosynthesis protein SbnB
SRIM_015305		<b>VOC family protein</b>
<b>Transport i metabolizam ugljikohidrata</b>		
SRIM_014675		family 20 glycosylhydrolase
SRIM_038725		chitinase
SRIM_018400		phosphoglucosamine mutase
<b>Transport i metabolizam koenzima</b>		
SRIM_031110		hypothetical protein
<b>Proizvodnja i pretvorba energije</b>		
SRIM_004135	narI	respiratory nitrate reductase subunit gamma
SRIM_008035		formate dehydrogenase
<b>Transport i metabolizam anorganskih iona</b>		
SRIM_020395		TerB family tellurite resistance protein
SRIM_021705		copper resistance protein CopC/CopD
<b>Transport i metabolizam lipida</b>		

SRIM_034830		CDP-alcohol phosphatidyltransferase family protein
SRIM_034815		CDP-alcohol phosphatidyltransferase family protein
<b>Transport i metabolizam nukleotida</b>		
SRIM_007130		bifunctional metallophosphatase/5'-nucleotidase
SRIM_016200		cytosine permease
SRIM_026280		class IV adenylate cyclase
<b>PROTEINI NEPOZNATE FUNKCIJE</b>		
SRIM_005685		acylase
SRIM_016550	yjjK	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein
SRIM_004015		DUF1684 domain-containing protein
SRIM_004795		class I SAM-dependent methyltransferase
SRIM_011090		GNAT family N-acetyltransferase
SRIM_022855		DUF4365 domain-containing protein
SRIM_006010		VOC family protein
SRIM_013120		hypothetical protein
SRIM_025050		Uma2 family endonuclease
SRIM_033380	griF	tyrosinase family protein
SRIM_008130		DUF1343 domain-containing protein
SRIM_012690		DUF3052 domain-containing protein
SRIM_023620	lsr	Lsr2 family protein
SRIM_026450		Lsr2 family protein
SRIM_015490		methyltransferase
SRIM_024195		DUF2993 domain-containing protein
SRIM_008270		hypothetical protein
SRIM_013790		hypothetical protein
SRIM_027250		hypothetical protein
SRIM_040715		CsbD family protein
SRIM_041605		hypothetical protein
SRIM_005045		hypothetical protein
SRIM_023975		hypothetical protein
SRIM_025755		hypothetical protein
SRIM_032570		hypothetical protein
SRIM_037320		hypothetical protein
SRIM_041390		hypothetical protein
SRIM_005555		DUF2637 domain-containing protein
SRIM_031725		hypothetical protein
SRIM_039280		hypothetical protein
SRIM_041680		hypothetical protein
SRIM_034900		hypothetical protein
SRIM_006040		CsbD family protein
SRIM_026075		hypothetical protein
SRIM_016670		hypothetical protein
SRIM_037950		hypothetical protein
SRIM_041470		hypothetical protein
SRIM_031330		hypothetical protein



SRIM_036260		hypothetical protein
SRIM_011925		hypothetical protein
SRIM_003935		LppX_LprAFG lipoprotein
SRIM_019780		hypothetical protein
SRIM_000370		hypothetical protein
SRIM_002490		type III effector protein
SRIM_010020		hypothetical protein
SRIM_014210		hypothetical protein
SRIM_041385		hypothetical protein
SRIM_007840		DUF3090 domain-containing protein
SRIM_020105		YbjN domain-containing protein
SRIM_021335		hypothetical protein
SRIM_025340		DUF2690 domain-containing protein
SRIM_028800		enhanced serine sensitivity protein SseB
SRIM_037200		DUF317 domain-containing protein
SRIM_037960		caspase family protein
SRIM_021445		YibE/F family protein
SRIM_025805		ABC transporter permease
SRIM_039000		HAD family hydrolase
SRIM_000380		hypothetical protein
SRIM_003100		hypothetical protein
SRIM_004435		hypothetical protein
SRIM_004815		hypothetical protein
SRIM_006765		hypothetical protein
SRIM_014460		MarR family transcriptional regulator
SRIM_014615		hypothetical protein
SRIM_016345		hypothetical protein
SRIM_022155		hypothetical protein
SRIM_025665		hypothetical protein
SRIM_032155		hypothetical protein
SRIM_041300		hypothetical protein
SRIM_026585		hypothetical protein
SRIM_019160		hypothetical protein
SRIM_030035		hypothetical protein
SRIM_037305		hypothetical protein
<b>SRIM_004440</b>		<b>DUF2795 domain-containing protein</b>
<b>SRIM_008570</b>		<b>gas vesicle protein</b>
<b>SRIM_020050</b>		<b>DUF3151 domain-containing protein</b>
<b>SRIM_021045</b>		<b>DUF5324 family protein</b>
<b>SRIM_023405</b>		<b>threonine/serine exporter family protein</b>
<b>SRIM_024700</b>		<b>DUF3027 domain-containing protein</b>
<b>SRIM_029625</b>		<b>DUF2469 domain-containing protein</b>
<b>SRIM_032285</b>		<b>DUF2795 domain-containing protein</b>
<b>SRIM_010030</b>		<b>hypothetical protein</b>
<b>SRIM_016615</b>		<b>hypothetical protein</b>
<b>SRIM_023855</b>		<b>hypothetical protein</b>
<b>SRIM_024965</b>		<b>hypothetical protein</b>
<b>SRIM_027495</b>		<b>hypothetical protein</b>

## 9. POPIS KRATICA

AA aminokiselina (engl. *amino acid*)

ABC amonijev bikarbonat

ACN acetonitril

APS amonijev persulfat

ATP adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

BSA (albumin seruma goveda, engl. *bovine serum albumine*)

C18 (engl. *octadecyl carbon chain*)

DTT ditiotretitol

ESI ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*)

FA mravlja kiselina (engl. *formic acid*)

FDR (engl. *false discovery rate*)

GO (engl. *gene-ontology*)

HPLC visokotlačna tekućinska kromatografija (engl. *high performance liquid chromatography*)

IAA jodoacetamid

kDa kilodalton

KEGG (engl. *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*)

LB Luria-Bertani hranjivi medij

LC tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

m/z omjer mase i naboja (enlg. *mass to charge ratio*)

M molarno mol/l (engl. *molar*)

MOPS (engl. *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*)

MS spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)

MS/MS tandemska spektrometrija masa (engl. *tandem mass spectrometry*)

PMSF fenilmetilsulfonyl fluorid (engl. *phenylmethanesulfonyl fluoride*)

PTM posttranslacijska modifikacija (engl. *posttranslational modification*)

PVDF poliviniliden difluorid (engl. *polyvinylidene difluoride*)

SB pufer za uzorkovanje (engl. *sample buffer*)

SDS natrijev dodecil dulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

STY serin/treonin/tirozin

STPK serin/treonin protein kinaza

TBST tris acetat EDTA pufer uz dodatak tween-a (engl. *Tris-buffered saline with Tween*)

TEMED N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin

TFA tri-fluoro-octena kiselina (engl. *trifluoroacetic acid*)

Tris Tris (hidroksimetil) aminometan (engl. *Tris(hydroxymethyl)aminomethane*)

## 10. ŽIVOTOPIS

Ela Šarić rođena je 12. svibnja 1991. u Zadru gdje je završila i srednju školu (Jezičnu gimnaziju Vladimir Nazor). Godine 2009. je upisala je integrirani preddiplomski i diplomski studij Biologije i Kemije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je u veljači 2015. na Zavodu za biokemiju PMF-a s temom "Seril-tRNA-sintetaza iz biljke *Arabidopsis thaliana*: stanična lokalizacija i priprema skraćenih varijanti proteina", pod mentorstvom dr. sc. Jasmine Rokov Plavec. Nakon diplome odradila je stručnu praksu u Laboratoriju za određivanje strukture i funkcije makromolekula na Institutu za integrativnu biologiju stanice Sveučilišta Paris-Sud u Orsay-u u Francuskoj (9/3/2015 - 31/07/2015), na istraživačkom projektu pod nazivom "Istraživanje atipičnih bakterijskih protein-kinaza", pod voditeljstvom dr. sc. Sylvie Nessler. Nakon toga je radila u OŠ Petra Zrinskog u Zagrebu (8/9/2015 - 21/11/2015) kao nastavnica kemije i prirode, te u OŠ Lovre pl. Matačića u Zagrebu (16/12/2015 - 15/6/2016) kao nastavnica biologije i prirode. Od 2016. god. je zaposlena u Laboratoriju za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu (prije Laboratorij za molekularnu genetiku, Zavod za molekularnu biologiju), a iste godine je upisala i doktorski studij Biologije na PMF-u u Zagrebu. Za vrijeme trajanja dokorskog studija radila je kao suradnik na UKF projektu "Comparative phosphoproteome analysis of *S. rimosus* oxytetracycline producers strains" pod mentorstvom dr. sc. Dušice Vujaklije, a od 2019. god. je zaposlena i na projektu Znanstvenog centra izvrsnosti "Bioprospecting Jadranskog mora". Članica je Hrvatskog mikrobiološkog društva, a od 2017.-2018. god. je bila i članica Hrvatskog društva za proteomiku. Od 2019. godine je suvoditeljica „Mladih istraživača“, sekcije Hrvatskog prirodoslovnog društva.