

Mistranslacija: opasnost ili prednost?

Kardaš, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:442501>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Katarina Kardaš

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

MISTRANSLACIJA: OPASNOST ILI PREDNOST?

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2024.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

31. kolovoza 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Biosinteza proteina.....	2
2.1.1. <i>Translacija.....</i>	2
2.1.2. <i>mRNA.....</i>	2
2.1.3. <i>tRNA.....</i>	2
2.1.4. <i>Aminoacil-tRNA-sintetaze.....</i>	4
2.1.5. <i>Ribosomi.....</i>	5
2.1.6. <i>Mehanizam translacije.....</i>	6
2.2. Mistranslacija.....	10
2.2.1. <i>Mistranslacija općenito.....</i>	10
2.2.2. <i>Uzroci mistranslacije.....</i>	11
2.2.3. <i>Tolerancija na mistranslaciju.....</i>	13
2.3. Tipovi mistranslacija.....	13
2.3.1. <i>Inherentna mistranslacija.....</i>	13
2.3.2. <i>Mistranslacija kao posljedica nepovoljnih uvjeta.....</i>	14
2.3.3. <i>Mistranslacija kod patogenih organizama.....</i>	16
2.3.4. <i>Misacilacija metioninom.....</i>	18
2.3.5. <i>Utjecaj mistranslacije na otpornost na antibiotike.....</i>	21
2.4. Zaključak.....	23
2.4.1. <i>Opasnost ili prednost?.....</i>	23
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXIV

§ Sažetak

U ovom radu je na primjerima različitih organizama od jednostaničnih prokariota i eukariota, do višestaničnih životinja poput miša i čovjeka obrađeno pitanje utjecaja mistranslacije proteina na njihovo zdravlje i preživljavanje. Opisani su utjecaji mistranslacije na navedene organizme uzimajući u obzir različite povoljne i nepovoljne uvjete u kojima se ti organizmi mogu naći ili u kojima žive. Predstavljani su zanimljivi primjeri eksperimenata koji ukazuju da različiti organizmi u različitim kontekstima imaju vrlo različitu toleranciju na mistranslaciju te da u nekim slučajevima ona čak može biti i poželjna. Obradeni su mehanizmi translacije i mistranslacije te su predstavljani najčešći izvori mistranslacija i mehanizmi obrane koje su kroz evoluciju organizmi razvili.

§ 1. UVOD

Sinteza i razgradnja proteina u stanici je visoko regulirani proces, proteini u stanicama obavljaju mnoge važne funkcije, a na njihovu sintezu otpada čak 90% energije utrošene u biosintetskim reakcijama, stoga je vrlo bitno da oni budu pravilno sintetizirani prema uputi zapisanoj u DNA te pravilno smotani kako bi postigli svoju nativnu strukturu. Translacija je zadnja faza u sklopu centralne dogme molekularne biologije koja opisuje put genetičke informacije od DNA do proteina.^[1]

Translacija ili prevođenje je vrlo složen proces u kojem sudjeluje velik broj enzima i kofaktora, a pored toga odvija se i jako brzo što znači da su pogreške neizbježne. Kada se takve pogreške događaju govorimo o mistranslaciji proteina. Stanice su kroz evoluciju razvile zanimljive mehanizme kojima nastoje spriječiti mistranslaciju poput domena za popravak na aminoacil-tRNA-sintetazama, međutim takvi mehanizmi popravka troše vrijeme i energiju pa nisu uvijek isplativi.^[1]

Različiti organizmi, a ponekad i različita tkiva ili čak stanični dijelovi unutar istog organizma imaju različitu toleranciju na mistranslaciju. Tolerancija na mistranslaciju može se razlikovati ovisno o uvjetima u kojima se organizam nalazi, te u određenim kontekstima mistranslacija može čak biti povoljna za organizam.^[3]

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Biosinteza proteina

2.1.1. Translacija

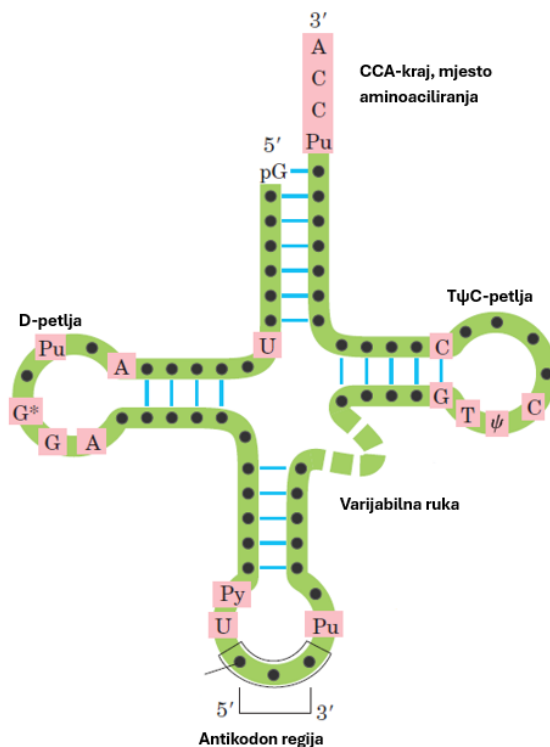
Da bi smo se mogli upoznati sa procesom mistranslacije i njezinim možebitnim posljedicama najprije ćemo se upoznati sa samom translacijom, njezinim mehanizmom i ključnim igračima koji sudjeluju u tom procesu. Translacija je gotovo sinonim za proces biosinteze proteina u kojem se genetička uputa iz DNA prepisana u mRNA prevodi u protein na ribosomima, pri čemu glavne uloge u procesu biosinteze proteina igraju glasnička RNA (mRNA), transportna RNA (tRNA), aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS), ribosomi i naravno aminokiseline.

2.1.2. mRNA

Proteini se sintetiziraju prema genetičkoj uputi iz DNA, a zadaću prijenosa te genetičke informacije od DNA do ribosoma ima mRNA, koja nastaje transkripcijom iz DNA pomoću enzima RNA-polimeraze. U procesu transkripcije sudjeluje dvolančana DNA koja je samo djelomično razmotana na samom mjestu djelovanja enzima. Pri tome jedan lanac DNA služi kao kalup, prema njemu se sintetizira mRNA, dok se drugi lanac naziva kodirajući i on zapravo ne sudjeluje u procesu transkripcije. Po završetku procesa nastaje mRNA koja je identična kodirajućem lancu uz razliku da je u mRNA baza timin zamijenjena uracilom.^[1]

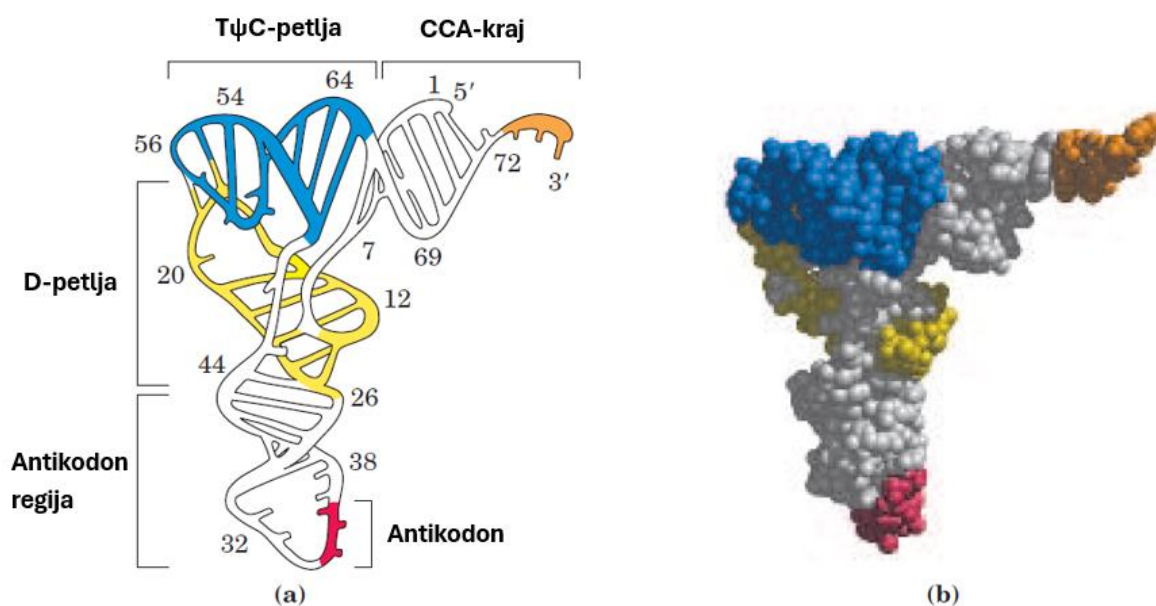
2.1.3. tRNA

Transportna RNA u procesu translacije sudjeluje tako što na ribosome dovodi aminokiseline i posreduje u procesu vezanja aminokiselina u rastući polipeptidni lanac poput adaptera. tRNA ima regiju koja je odgovorna za čitanje kodona na mRNA te regiju na koju se veže aminokiselina koja odgovara tom kodonu, jer ne postoji dovoljna razina specifičnosti da bi se aminokiseline i kodoni na mRNA prepoznavali direktno.^[1] Po svojoj strukturi, i eukariotske i prokariotske tRNA su jednolančane molekule od 70 – 90 nukleotida koji ostvaruju unutarlančane interakcije i međusobno se sparuju rezultirajući sekundarnom strukturom u obliku djeteline (slika 1).^[1]



Slika 1. Sekundarna struktura molekule tRNA. (Preuzeto i prilagođeno: A. L. Lehninger, D. L. Nelson i M. M. Cox, *Principles of Biochemistry (4th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2004. str. 1050.)

U strukturi molekule tRNA tako možemo definirati antikodonsku regiju, CCA-kraj, D-petlju, T ψ C-petlju i varijabilnu ruku (slika 1). Antikodonska regija je dio molekule koji se na ribosomima veže na odgovarajući kodon mRNA uglavnom prema Watson-Crickovim pravilima, CCA-kraj je dio tRNA na koji se veže odgovarajuća aminokiselina, a D-petlja koja sadrži nukleotid dihidrouridin te T ψ C-petlja koja sadrži ribotimidin i pseudouridin imaju važnu ulogu u interakcijama slaganja (eng. *stacking interactions*) tijekom smatanja tRNA u 3D strukturu koja podsjeća na slovo „L“ (slika 2). T ψ C regija dodatno ostvaruje interakcije i sa rRNA velike ribosomske podjedinice pri vezanju tRNA na ribosom.^[1]

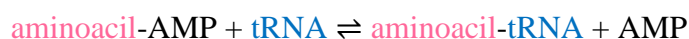
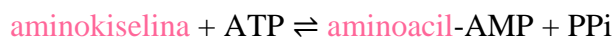


Slika 2. 3D struktura molekule tRNA: a) Shematski dijagram, b) Kalotni model. (Preuzeto i prilagođeno: A. L. Lehninger, D. L. Nelson i M. M. Cox, *Principles of Biochemistry (4th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2004. str. 1050.)

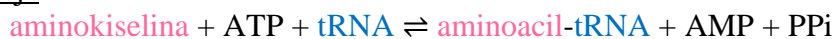
2.1.4. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji prepoznaju i vežu odgovarajuću aminokiselinu na pripadnu tRNA, odnosno kataliziraju reakciju aminoaciliranja tRNA koja se odvija u dva koraka. U prvom koraku karboksilna skupina aminokiseline napada α -fosforilnu skupinu ATP-a pri čemu nastaje anhidridna veza tj. međuprodukt aminoacil-adenilat, u drugom koraku aminoacilna skupina se prebacuje na tRNA uz izdvajanje AMP-a i pirofosfata. Pirofosfat podliježe hidrolizi koju katalizira enzim pirofosfataza čime se osigurava ireverzibilnost reakcije. Enzimi aaRS su tipično specifični za pojedinu aminokiselinu u stanici i igraju važnu ulogu u održavanju točnosti translacije.^[1]

Kemijske reakcije aminoaciliranja:

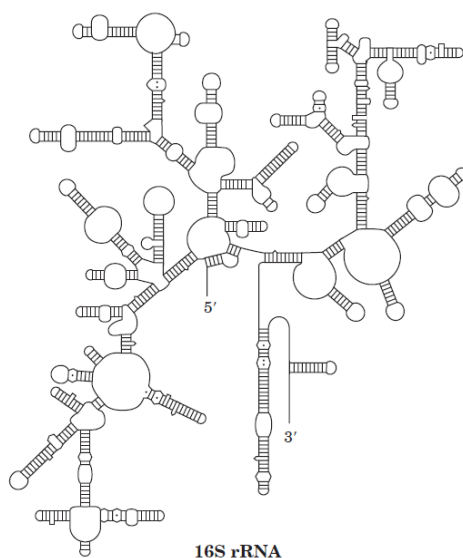


Sumarna reakcija:



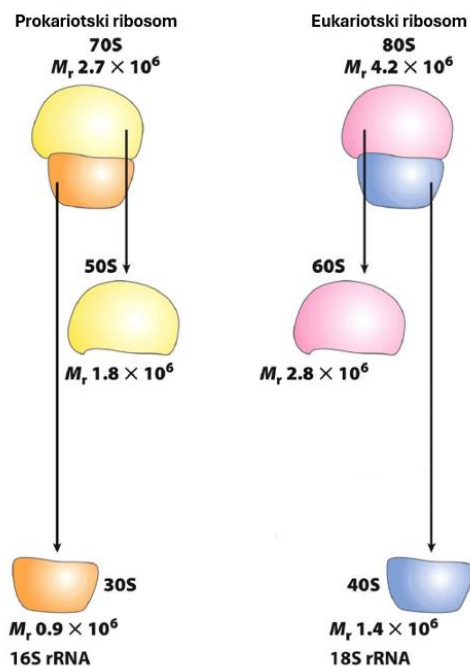
2.1.5. Ribosomi

Ribosomi su supramolekulski kompleksi građeni od ribosomskih proteina i jednolančanih ribosomskih RNA (rRNA). Po uzoru na tRNA, rRNA također ostvaruje unutarlančano sparivanje nukleotida što na kraju rezultira složenom sekundarnom i tercijarnom strukturom (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz sekundarne strukture 16S rRNA bakterijskog ribosoma. (Preuzeto i prilagođeno: A. L. Lehninger, D. L. Nelson i M. M. Cox, *Principles of Biochemistry (4th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2004. str. 1049.)

Ribosomi svih živih bića imaju dvije podjedinice, veliku i malu koje se kod eukariota i prokariota razlikuju po sedimentacijskom koeficijentu i veličini (slika 4). Postoje još i neke razlike u vrsti veznih mjesta koje posjeduju te u proteinskom sastavu, pri čemu prokariotski ribosomi sadrže oko 55 proteina dok eukariotski sadrže oko 80 proteina.^[1] Unatoč strukturnim razlikama imaju istu zadaću tj. kataliziranje nastajanja peptidne veze tijekom sinteze proteina, ali sudjeluju i u osiguravanju točnosti translacije zahvaljujući prirodni veznih mjesta i arhitekturi sredine u kojoj se ta vezna mjesta nalaze. Ribosomi sadrže tri vezna mjesta za tRNA: A mjesto koje veže aminoaciliranu tRNA, P mjesto koje veže peptidil-tRNA te E (od *exit*) mjesto s kojeg disocira deacilirana tRNA. Aktivno mjesto u kojem nastaje peptidna veza zove se peptidil-transferazni centar (PTC) i nalazi se u velikoj podjedinici.



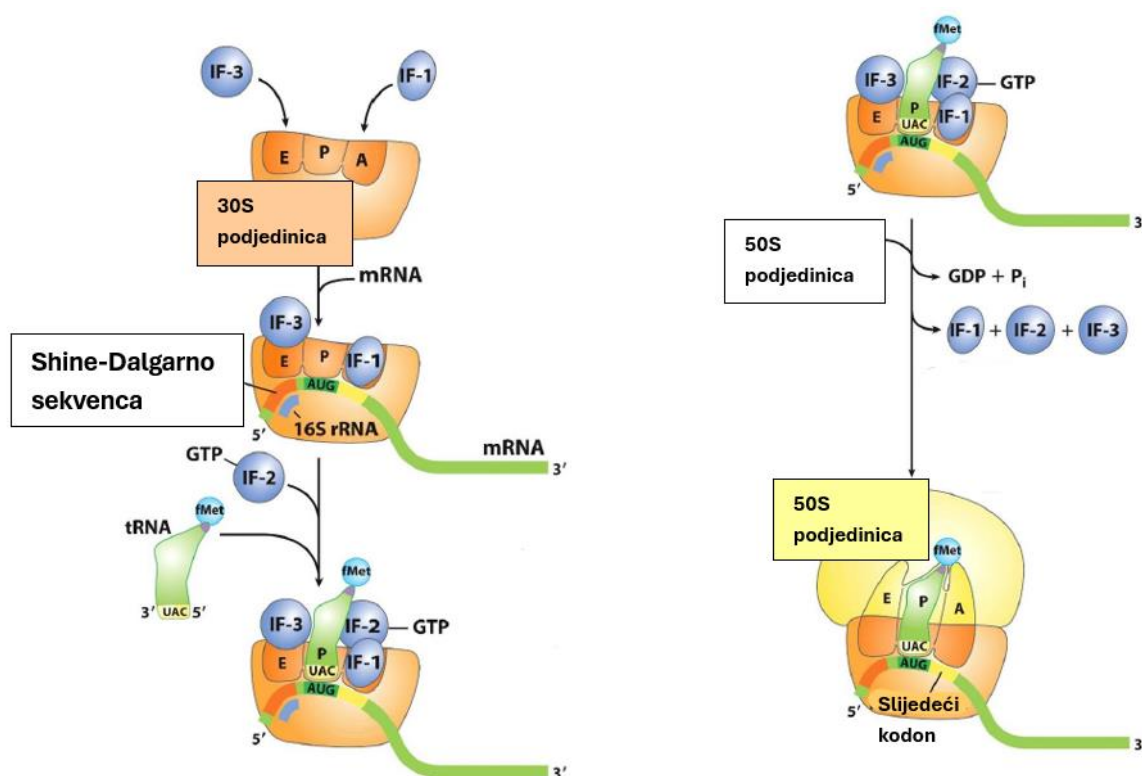
Slika 4. Usporedba veličine i sedimentacijskih koeficijenata prokariotskih i eukariotskih ribosoma. (Preuzeto i prilagođeno: Albert L. Lehninger, David L. Nelson i Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry (8th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2021. str. 3526.)

2.1.6. Mehanizam translacije

Mehanizam translacije povoljno je obraditi na primjeru prokariota jer je nešto jednostavniji, međutim proces se kod eukariota odvija na gotovo isti način uz neke razlike uglavnom u procesu inicijacije. Proces translacije se i kod eukariota i prokariota može podijeliti u tri glavna koraka; inicijacija, elongacija i terminacija.

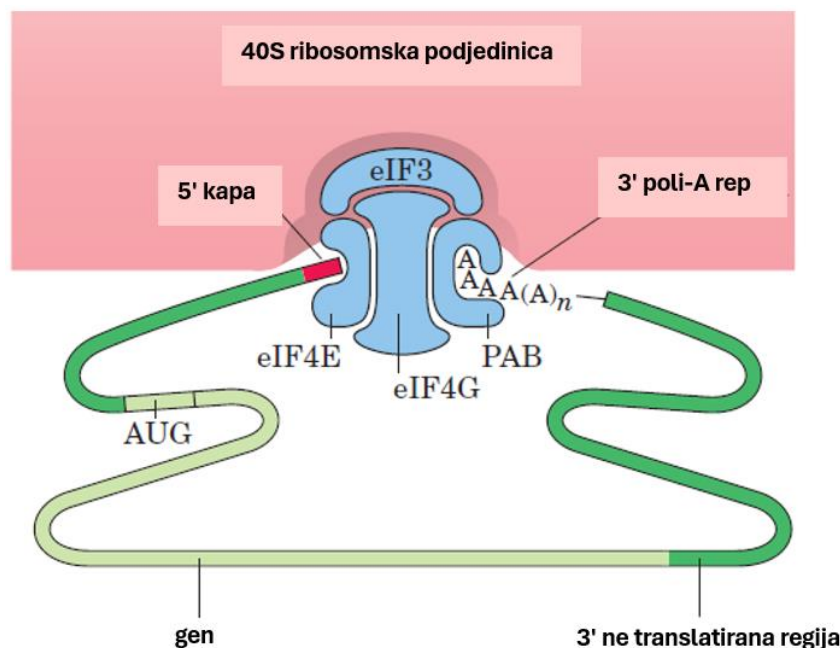
Inicijacija kod eukariota i prokariota podrazumijeva nastajanje inicijacijskog kompleksa (slike 5 i 6) odnosno spajanje male ribosomske podjedinice sa mRNA, inicijacijskom tRNA i velikom ribosomskom podjedinicom. Kod prokariota ovaj proces započinje vezanjem male ribosomske podjedinice s inicijacijskim faktorima IF-3 i IF-1 koji sprječavaju prerano spajanje velike i male podjedinice bez mRNA, zatim se na malu ribosomsku podjedinicu veže mRNA i to na način da se START kodon (AUG) pozicionira u P mjesto ribosoma. Ispravan okvir čitanja tj. odabir ispravnog START kodona u mRNA bakterija određuje se pomoću Shine-Dalgarnove sekvence. To je konsenzusna sekvenca očuvana u mnogim bakterijama koja se komplementarno veže na rRNA u blizini P mjesta čime se osigurava da će prvi AUG kodon koji slijedi iza Shine-Dalgarnove sekvence biti prepoznat kao START kodon.^[1] U P mjesto se

zatim veže prokariotska inicijacijska tRNA, a u mjesto A sjeda IF-2 faktor na kojeg je vezan GTP. Prokariotska inicijacijska tRNA na sebi nosi formilirani metionin da bi se mogla razlikovati od Met-tRNA^{Met} koja nosi metionin koji se treba ugraditi u unutrašnji dio polipeptidnog lanca. Jedino se fMet-tRNA^{fMet} može vezati direktno u mjesto P, dok se sve ostale tRNA, uključujući Met-tRNA^{Met}, vežu najprije u mjesto A.^[1] Nakon vezanja mRNA, svih inicijacijskih faktora i inicijacijske tRNA dolazi do hidrolize GTP-a sa IF-2, inicijacijski faktori se otpuštaju sa kompleksa, a velika podjedinica konačno pristaje na malu te može započeti faza elongacije.



Slika 5. Shematski prikaz tijeka faze inicijacije kod prokariota. (Preuzeto i prilagođeno: Albert L. Lehninger, David L. Nelson i Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry* (8th edition), W. H. Freeman and company, New York, 2021. str. 3520.)

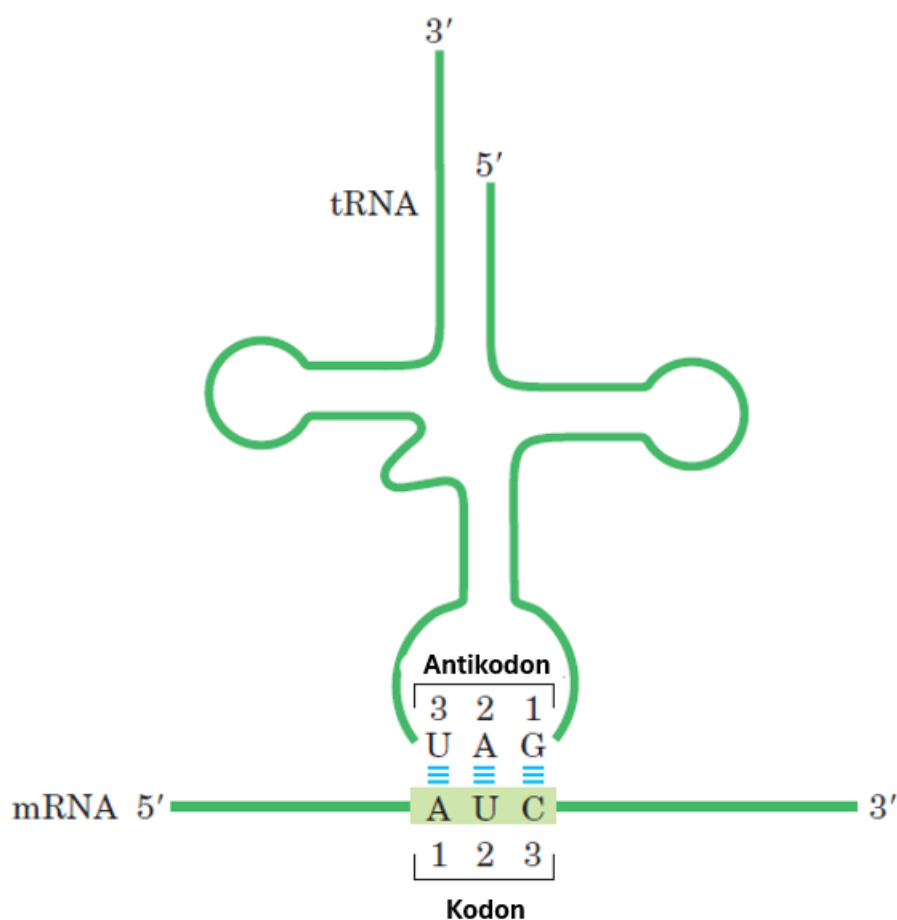
Kod eukariota tijekom faze inicijacije ne vrši se formiliranje metionina već se mRNA koja ima modificirani 5'-kraj veže na ribosom u kompleksu s nekoliko proteina (slika 6). Na 3'-kraj mRNA vezan je protein PAB (eng. *poly(A) binding protein*), a mRNA je orijentirana tako da su joj 3'- i 5'-krajevi spojeni. Tako nastala kružna mRNA se skenira od 5'-kraja te prvi AUG kodon predstavlja početak okvira čitanja.^[1]



Slika 6. Shematski prikaz inicijacijskog kompleksa eukariota. (Preuzeto i prilagođeno: Albert L. Lehninger, David L. Nelson i Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry (4th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2004. str. 1057)

Faza elongacije započinje tako što se u mjesto A veže aminoacil-tRNA čiji antikodon odgovara prvom kodonu mRNA nakon START kodona. Dolazi do nastajanja peptidne veze između aminokiseline na inicijacijskoj tRNA i aminokiseline na aminoacil-tRNA koja se vezala u mjesto A. tRNA u mjestu A se pomoću elongacijskog faktora G translocira u mjesto P dok se inicijacijska tRNA premješta u mjesto E i odlazi sa ribosoma. Ovaj proces se ponavlja dok se ne sintetizira cijeli polipeptidni lanac. Eukariotski ribosomi ne posjeduju mjesto E već se deacilirane tRNA otpuštaju s ribosoma direktno iz mjesta P.^[1] Aminoacil-tRNA se za ribosom veže u kompleksu sa EF-Tu:GTP koji štiti estersku vezu između aminokiseline i tRNA, a zahvaljujući svojoj GTP-aznoj aktivnosti sudjeluje i u osiguravanju točnog sparivanja kodona u mRNA i antikodona u tRNA. Kompleksi EF-Tu:GTP i EF-Tu:GDP su kratkoživući i brzo se izmjenjuju. S obzirom da se aminoacilirane tRNA na ribosom vežu metodom pokušaja i pogreške, što je ovaj proces duži to ribosom ima više vremena provjeriti je li došlo do ispravnog sparivanja kodona i antikodona. U veznom mjestu A male ribosomske jedinice u blizini mjesta sparivanja prve dvije baze kodona i druge dvije baze antikodona smještene su baze adenin i gvanin ribosomske RNA koje ostvaruju specifične vodikove veze sa bazama u mRNA i tRNA, te na taj način stabiliziraju sustav kada se radi o ispravno sparenim bazama. No, ukoliko se

spare nekomplementarne baze na ovim položajima tRNA će disocirati jer ne dolazi do ispravnih interakcija sa specifičnim adeninom i gvaninom rRNA, te izostaje stabilizacija sustava. Ovaj mehanizam provjere zove se „molekulska ravnala“. Ovaj dodatni korak provjere izostaje kada se sparuju treća baza kodona i odgovarajuća prva baza antikodona (ako oba lanca čitamo od 5'-prema 3'-smjeru, slika 7). Sparivanje prve dvije baze kodona i njihove komplementarne baze na antikodonu odgovorno je za specifičnost vezanja dok sparivanje treće baze kodona i prve baze antikodona može varirati.



Slika 7. Shematski prikaz sparivanja antikodona u tRNA i kodona u mRNA. (Preuzeto i prilagođeno: Albert L. Lehninger, David L. Nelson i Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry (4th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2004. str. 1039)

Prva baza antikodona ujedno se naziva kolebljivom bazom jer neke baze na tom položaju mogu ostvarivati interakcije s više od jedne baze na trećem položaju kodona (tablica 1). Na primjer, neke tRNA sadrže na prvom položaju antikodona nukleotid inozinat koji kao bazu ima hipoksantin. Inozinat primjerice može ostvariti vodikove veze sa tri druga nukleotida (tablica

1). Svrha kolebljive baze je povećati brzinu translacije. Kada bi za uspješno vezanje tRNA na ribosom bilo potrebno podudaranje sva tri nukleotida u antikodonu sa tri nukleotida u kodonu stanici bi bila potrebna po jedna tRNA za svaki kodon te bi disocijacija tRNA s ribosoma bila puno sporija kada bi komplementarno bile vezane tri baze umjesto dvije.^[1] Također, kolebljiva baza omogućuje da jedna tRNA može prepoznati više kodona iz čega slijedi da jednu aminokiselinu može kodirati više kodona što dovodi do degeneriranosti genetičkog koda.

Tablica 1. Dozvoljeni parovi baza prema teoriji kolebljive baze.^[1]

Prva baza antikodona	Treća baza kodona
C	G
A	U
U	A ili G
G	U ili C
I	U, C ili A

Ako je došlo do uspješnog prepoznavanja baza dolazi do konformacijskih promjena na tRNA, a time i na EF-Tu:GTP, dolazi do hidrolize GTP-a i tRNA sjeda u mjesto A. CCA-kraj tRNA u mjestu A približava se CCA-kraju tRNA u mjestu P i dolazi do nukleofilnog napada amino skupine na karbonilnu skupinu i nastajanja peptidne veze. Ova reakcija se zbiva u peptidil-transferaznom centru (PTC) koji je smješten u velikoj ribosomskoj podjedinici i građen većinom od rRNA. S obzirom da proteini ne sudjeluju u katalizi, ribosom je ribozim. Po nastajanju peptidne veze dolazi do prijenosa polipeptidnog lanca sa tRNA u mjestu P na tRNA u mjestu A i translacije tj. pomicanja sustava za jedan kodon pri čemu se vezno mjesto A opet oslobađa za nadolazeću aminoacil-tRNA.^[1]

Posljednji korak translacije je terminacija, ona nastupa kada na red za čitanje dođe STOP kodon. STOP kodone ne prepoznaju molekule tRNA već faktori otpuštanja (eng. *release factors*) koji se vežu u mjesto A i potiču hidrolizu esterske veze peptidil-tRNA u peptidil-transferaznom centru nakon čega se sintetizirani polipeptid otpušta sa ribosoma. Na kraju translacije dolazi do disocijacije ribosomskih podjedinica i otpuštanja mRNA.^[1]

2.2. Mistranslacija

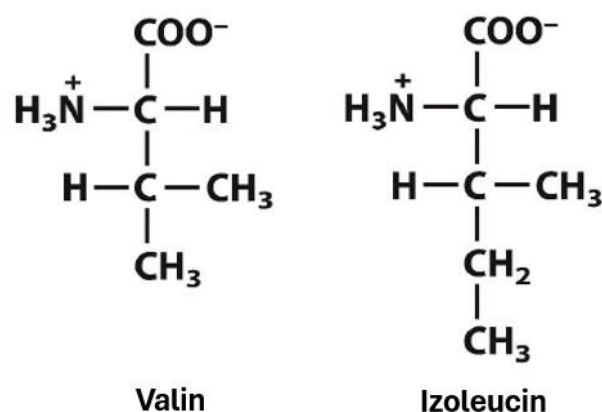
2.2.1. Mistranslacija općenito

Mistranslacija je pojava do koje dolazi kada se u nekom od opisanih koraka translacije dogodi greška te se u polipeptid ugradi kriva aminokiselina, što rezultira proteinom koji nije točan odraz genetske upute u DNA.^[1] Različiti organizmi razvili su niz različitih mehanizama kojima nastoje smanjiti učestalost mistranslacije no u nekoj mjeri mistranslacija je neizbježna, a kako ćemo vidjeti može čak i povoljno utjecati na organizme i njihove šanse za preživljavanje pod određenim uvjetima.

Stanica ima izrazito velike potrebe za proteinima naročito zato što neki od proteina imaju vrlo kratki životni vijek i potrebno ih je razgraditi i ponovno sintetizirati u kratkom roku. Kako bi se osigurala dovoljno brza sinteza proteina, stanica mora u ime brzine žrtvovati točnost u nekoj mjeri. Naravno, protein i dalje mora ostati funkcionalan i mora se moći pravilno smotati. Točnost translacije u većini slučajeva je takva da se na svakih 10 000 aminokiselina ugradi jedna pogrešna, ova razina točnosti pokazala se kao prikladnom za postizanje ravnoteže između točnosti i brzine.^[1] Dva najveća izvora mistranslacije su greške pri aminoaciliranju tRNA, tj. greške u funkciji aaRS enzima zbog čega se na ribosom veže tRNA koja na sebi nosi krivu aminokiselinu ili greške do kojih dolazi na ribosomima kada se na ribosom veže tRNA čiji antikodon ne odgovara kodonu u mRNA.^[3]

2.2.2. *Uzroci mistranslacije*

U većini organizama kao što je već spomenuto postoji aaRS za svaku aminokiselinu. Tijekom aminoaciliranja tRNA ostvaruju se brojne interakcije između tRNA i aaRS enzima, stoga enzimu nije tako teško prepoznati ispravnu tRNA. Međutim, problem se javlja pri prepoznavanju odgovarajuće aminokiseline jer su one puno manje od tRNA i u usporedbi sa tRNA ostvaruju manje interakcija sa aaRS enzimima. Ovaj problem je naročito izražen kada se radi o aminokiselinama slične strukture, veličine i svojstava pa se tako u proteinima često na mjestu izoleucina nađe valin jer izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) teško razlikuje ove dvije vrlo slične aminokiseline koje se razlikuju samo u jednoj metilnoj skupini (slika 8).



Slika 8. Strukturne formule valina i izoleucina. (Preuzeto i prilagođeno: Albert L. Lehninger, David L. Nelson i Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry (4th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2004. str. 1053)

Priroda je ovaj problem riješila tako što su se na nekim aaRS enzimima razvile domene za popravak (eng. *editing domains*). To su dodatna aktivna mjesta na aaRS enzimima koja imaju hidrolitičku aktivnost i u kojima se na temelju vrlo malih razlika u kemijskim svojstvima ili veličini bočnog ogranka aminokiseline prepoznaje kada je neka slična aminokiselina greškom vezana za nepripadnu tRNA. Arhitektura domene za popravak na enzimu IleRS je takva da bočni ogranak izoleucina zbog svoje dodatne metilne skupine ne stane u aktivno mjesto domene za popravak dok bočni ogranak valina pristaje jer je manji, tako enzim primjećuje pogrešku i hidrolizira isključivo vezu između valina i tRNA^{Ile}. Ukoliko domene za popravak iz nekog razloga izgube svoju funkciju, učestalost mistranslacije se povećava.^[3] Funkcija aaRS igra vrlo važnu ulogu u održavanju točnosti translacije jer jednom kada aminoacilirana tRNA dospije na ribosom i dođe do uspješnog sparivanja kodona i antikodona, u protein se ugrađuje ona aminokiselina koju tRNA nosi na sebi bez obzira odgovara li kodon mRNA aminokiselini koju nosi tRNA.^[1]

Postoje i drugi izvori mistranslacije koji su manje česti; na primjer može doći do grešaka u transkripciji (jedna na svakih 10⁵ nukleotida) ili replikaciji (jedna na svakih 10⁸ nukleotida) koje se zatim prenose u translaciju.^[3] Postoje i neki organizmi poput bakterije *Mycobacterium tuberculosis* koji aminoaciliranje tRNA moraju obavljati u dva koraka uz dodatni enzim. Ovim organizmima nedostaju specifični aaRS enzimi za aminokiseline glutamin i asparagin te umjesto njih imaju nespecifične AspRS i GluRS koji namjerno vežu aspartat na tRNA^{Asn} i

glutamat na tRNA^{Gln}. Tek u drugom koraku GatCAB enzimski kompleks katalizira zamjenu aspartata s asparaginom te glutamata sa glutaminom te nastaju Asn- tRNA^{Asn} i Gln- tRNA^{Gln}. Ovakav proces povećava mogućnost greške ako je na primjer enzimski kompleks mutiran ili se neki od koraka preskoči.^[3,4,5]

2.2.3. Tolerancija na mistranslaciju

Mnoga istraživanja utjecaja mistranslacije na organizme provode se tako da se namjerno uvode mutacije na aaRS enzime koji uzrokuju gašenje njihovih domena za popravak. Jedan takav eksperiment proveden je na miševima. Točkasta mutacija na genu koji kodira za alanil-tRNA-sintetazu uzrokovala je gubitak funkcije domene za popravak što je imalo za posljedicu ugrađivanje serina umjesto alanina, kod mutiranih organizama javila su se oštećenja Purkinjeovih stanica malog mozga uslijed agregacije nepravilno sintetiziranih i smotanih proteina.^[6] Sličan eksperiment proveden je na mušici *Drosophila melanogaster* kada je gašenje domena za popravak fenilalanil-tRNA-sintetaze (PheRS) uzrokovalo zamjenu fenilalanina sa njemu sličnim tirozinom, posljedice ovakve zamjene bile su oštećenje živčanih stanica, remećenje razvoja i lokomotornih funkcija te kraći životni vijek mušica.^[7]

Eksperimenti provedeni na bakteriji *Escherichia coli* pokazuju da ona može tolerirati čak oko 10% neispravno sintetiziranih proteina. Osim klasičnih načina obrane protiv mistranslacije kao što su domene za popravak ili EF-Tu barijera, kada je koncentracija defektnih proteina u stanici porasla došlo je do sličnog odgovora kao u slučaju izlaganja stanice toplotnom šoku odnosno došlo je do povećanja koncentracije proteina iz obitelji HSP (eng. *heat shock protein*) što potiče ili popravak proteina ako je to moguće ili njihovu razgradnju u proteasomu.^[8]

Tolerancija pojedinih organizama na translaciju može se razlikovati i u različitim dijelovima stanice. Na primjer, citosolni PheRS u gljivici *Saccharomyces cerevisiae* ima domenu za popravak i relativno nisku specifičnost za fenilalanin, dok mitohondrijski ovisi samo o svojoj visokoj specifičnosti (nastaje jedna Tyr-tRNA^{Phe} na 7,300 Phe-tRNA^{Phe}) i nema domenu za popravak. Gašenje domena za popravak na citosolnom PheRS gljivica je dobro tolerirala dok je povećanje učestalosti mistranslacije u mitohondriju bilo pogubno za organizam.^[9]

2.3. Tipovi mistranslacija

2.3.1. Inherentna mistranslacija

Kada se vjerojatnost mistranslacije povećava zbog same prirode mehanizma nekog od koraka translacije govorimo o inherentnim mistranslacijama. Već je spomenuto da će aaRS lakše pogriješiti kada postoji strukturni analog aminokiseline za koju je taj aaRS specifičan. Vjerojatnost da se dogodi takva greška proizlazi iz same strukture enzima i aminokiselina pa stoga ovakvu grešku smatramo inherentnom.^[3] Istraživanja provedena na tirozil-tRNA-sintetazi iz stanica jajnika kineskog hrčka pokazala su da se umjesto tirozina na tRNA^{Tyr} može vezati njemu sličan fenilalanin. Obrađena su antitijela koja su stanice hrčka lučile te je primijećeno da se ova zamjena događa u manjoj mjeri (0,01% po Tyr kodonu) kada su stanice imale dovoljno tirozina na raspolaganju, no u uvjetima pomanjkanja tirozina zamjena fenilalanina sa tirozinom postala je učestalija (0,07% po Tyr kodonu).^[10]

Ranije opisan netipičan način aminoaciliranja kod *M. tuberculosis* također spada pod inherentne mistranslacije jer rizik da se tRNA koja nosi pogrešnu aminokiselinu uspješno veže na enzim prije djelovanja GatCAB enzim kompleksa također proizlazi iz same prirode mehanizma.^[3,4,5]

2.3.2. Mistranslacija kao posljedica nepovoljnih uvjeta

Ovaj tip mistranslacije javlja se kao posljedica oštećenja mehanizma translacije ili kao posljedica uvjeta u kojima se neki organizam nalazi. Oksidacijski stres podrazumijeva prisutnost reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) poput H₂O₂, ·OH radikala, ·O²⁻ radikala u stanici. Ovi spojevi su nepoželjni u organizmu jer mogu reagirati s mnogim osjetljivim biomolekulama čija je ispravna funkcija neophodna za život; mogu oštetiti DNA, RNA, lipide i proteine, a naročito aaRS enzime tako što oksidiraju aminokiselinske ostatke u njihovim domenama za popravak čime one gube svoju funkciju.^[11]

Kada je bakterija *E. coli* bila uzgajana u prisustvu H₂O₂ i serina zabilježena je češća zamjena treonina serinom, bakterije su sporije rasle te se smanjio utrošak ATP-a kojeg aaRS enzimi troše prilikom popravljavanja grešaka. Naime, došlo je do oksidacije Cys182 u domeni za popravak treonil-tRNA-sintetaze što je uzrokovalo gubitak njezine funkcije. Ovaj efekt djelomično je potisnut dodatkom ditionitrola (DTT) na hranjivu podlogu nakon čega je rast ubrzan što je bio dokaz da je oksidacija ključnog Cys182 reverzibilna. Proveden je i sličan pokus gdje su vodikovom peroksidu bila izložena dva soja bakterije *E. coli* - divlji tip te soj koji nije imao na raspolaganju funkcionalne proteaze. Rast oba soja usporen je u prisutnosti vodikovog peroksida i serina, ali je rast bakterije divljeg tipa uspješno ubrzan povećanjem koncentracije treonina na hranjivoj podlozi dok je brzina rasta drugog soja samo djelomično

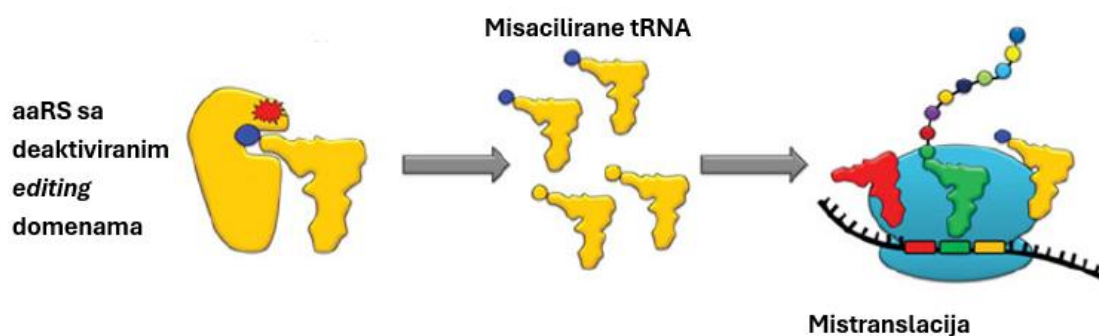
ubrzana. Ovaj rezultat sugerira da soj kojemu su nedostajale proteaze nije mogao pokrenuti ranije opisani stanični odgovor u vidu poticanja sinteze i razgradnje proteina koji bakterije inače pokreću u uvjetima toplinskog šoka ili izlaganja kemijskim stresorima.^[11]

Reaktivne kisikove vrste mogu reagirati i sa samim aminokiselinama, na primjer sa fenilalaninom pri čemu nastaje neproteinogena aminokiselina meta-Tyr. Kada su sojevi bakterije *E. coli* divljeg tipa te soj s onesposobljenom PheRS domenom za popravak uzgajani uz prisutnost vodikovog peroksida i Fe²⁺ iona, rast soja bez sposobnosti uređivanja drastično se smanjio kada je samo 1% fenilalanina zamijenjen m-Tyr. Ovaj rezultat ukazuje da je mistranslacija neproteinogenim aminokiselinama puno manje tolerirana od mistranslacije pogrešnom proteinogenom aminokiselinom.^[12]

2.3.3. Mistranclacija kod patogenih organizama

Patogeni organizmi izloženi su jedinstvenim stresorima od strane svojih domaćina, kao što su pH, temperatura, kemijski stresori ili razni odgovori imunološkog sustava domaćina.^[14]

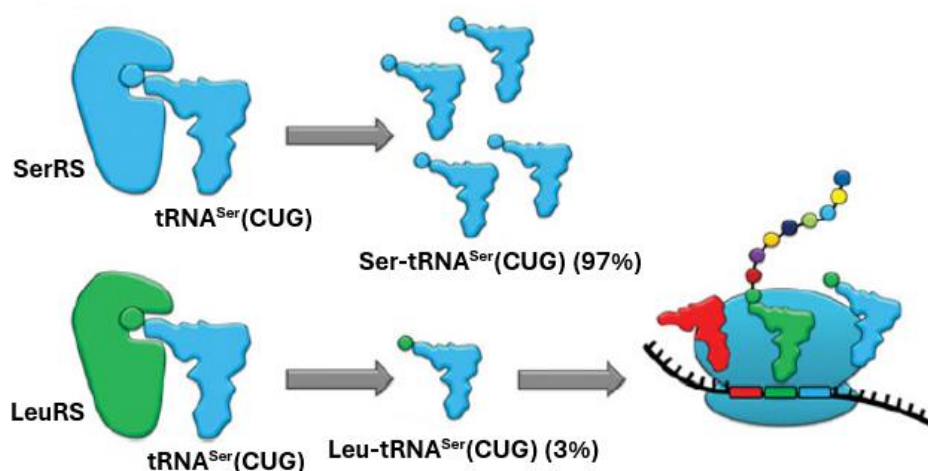
Mikoplazme su red bakterija bez stanične stijenke te najmanji jednostanični mikroorganizmi, uzročnici su mnogih bolesti kod životinja i čovjeka. Mikoplazme u svojim domaćinima uspješno mogu parazitirati jer imaju raznolike proteine na površini membrana te ih imunološki sustav domaćina zbog toga teže prepoznaje i pamti. Njihova fenotipska raznolikost je iznenađujuća s obzirom da imaju vrlo reducirane genome. Istraživanja sinteze proteina u mikoplazmama ukazuju na to da su ovi organizmi prirodno razvili mutacije koje uzrokuju gašenje domena za popravak na aaRS enzimima (slika 9) te se smatra da je ovaj potez bio evolucijska prilagodba zahvaljujući kojoj sintetiziraju vrlo raznolike proteine unatoč reduciranim genomima. *Mycoplasma mobile* koji parazitira u ribama uzgajan je u optimalnim uvjetima i unatoč tomu PheRS i leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) pokazivali su učestalost greške od otprilike 1/200 što je ukazivalo na nisku specifičnost ovih enzima te na slabu aktivnost njihovih domena za popravak. Čak je otkriveno da LeuRS ovog organizma za razliku od LeuRS u drugim organizmima niti nema domen za popravak.^[13]



Slika 9. Shematski prikaz misacilacije kod mikoplazmi uslijed gašenja domena za popravak. (Preuzeto i prilagođeno: M. H. Schwartz, T. Pan, Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts, 2016.)

Gljivica *Candida albicans*, uzročnik gljivičnih infekcija u ljudi, razvila je zanimljiv način čitanja CUG kodona, koji tipično u svim ostalim organizmima kodira za leucin. No, u ovoj gljivici se translata kao serin u 97% slučajeva dok se kao leucin čita u samo 3% slučajeva

(slika 10). Razvoj ovakvog dvoznačnog kodona rezultira raznolikim proteinima što je slično kao kod mikoplazme bitno za membranske proteine odgovorne za interakciju s domaćinom. Istraživanje provedeno uspoređujući soj *C. albicans* divljeg tipa i soj koji zamjenjuje leucin serinom u 28% slučajeva otkrio je da jedinke roda sklonijeg zamjeni pokazuju veću sposobnost vezanja na stanice domaćina te su manje podložne fagocitiranju od strane makrofaga miša. Leucin i serin imaju različita kemijska svojstva, serin je hidrofilan dok je leucin hidrofoban. Učestala zamjena ove dvije aminokiseline rezultira i promjenom svojstava proteina pa će tako povećana hidrofobnost proteina na površini gljivice povoljno utjecati na njezinu sposobnost da se veže na stanice domaćina. CUG mistranslacija uzrokovala je i smanjenu koncentraciju β -glukana na površini stanice gljivice. Ove polisaharide prepoznaju receptori na makrofagima domaćina pa je jasno zašto su gljivice koje su češće krivo prevodile CUG kodon kao serin bile manje podložne fagocitozi.^[15]



Slika 10. Shematski prikaz misacilacije kod gljivice *C. albicans* uslijed dvojake interpretacije CUG kodona. (Preuzeto i prilagođeno: M. H. Schwartz, T. Pan, Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts, 2016.)

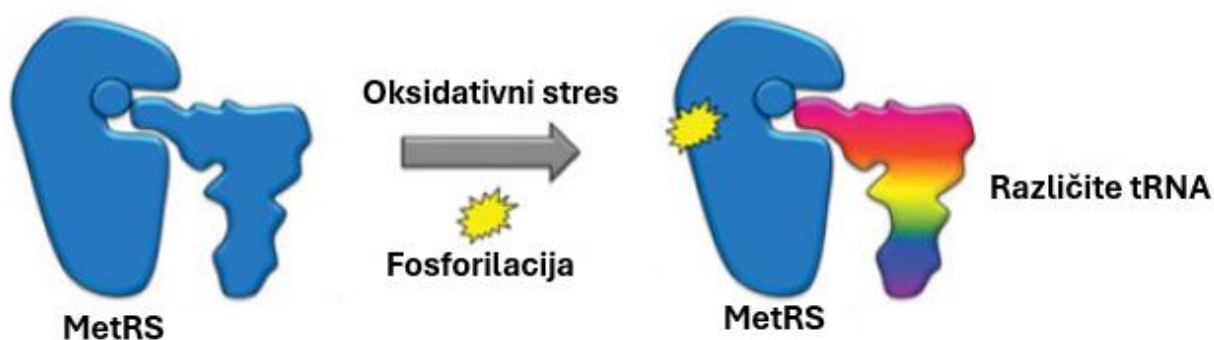
Neki patogeni organizmi poput bakterije *Salmonella enterica* razvili su kroz evoluciju optimalnu translacijsku točnost. Pokusi na zaraženoj ribi zebrića pokazali su da bilo kakvo odstupanje od optimalne učestalosti mistranslacije ima nepovoljan utjecaj na virulentnost salmonеле, čak i povećanje točnosti translacije nepovoljno je utjecalo na preživljavanje bakterije. Promjena

učestalosti mistranslacije postignuta je uvođenjem točkastih mutacija u gene za ribosomske proteine. Mutacije u genu *rpsD* smanjivale su točnost translacije dok su mutacije u genu *rpsL* povećavale točnost, u oba slučaja opažena je supresija gena iz skupine SPI-1 (eng. *salmonella pathogenicity island 1*) koji su odgovorni za virulentnost salmonele.^[16]

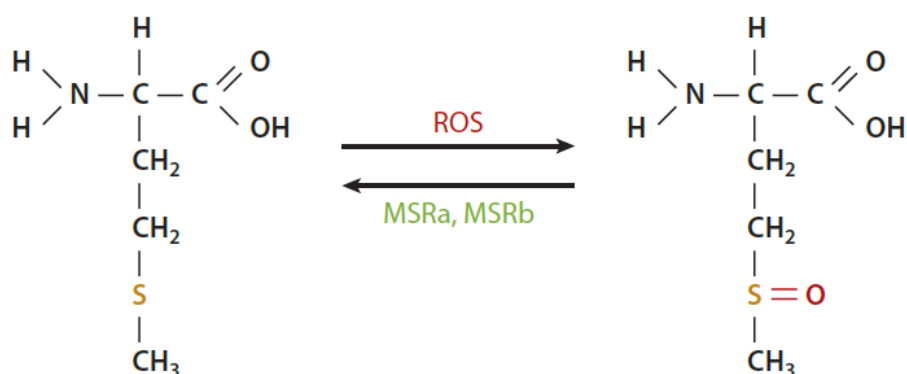
2.3.4. Misacilacija metioninom

Misacilacija metioninom je zanimljiv tip mistranslacije jer istraživanja pokazuju da se može regulirati ovisno o uvjetima u kojima se organizam nalazi, najbolje istraženi primjeri ovog tipa mistranslacije su mistranslacija metioninom kod sisavaca, bakterije *E. coli* i arheje *Aeropyrum pernix*.

U optimalnim uvjetima u stanicama sisavaca samo oko 1% staničnih tRNA greškom nosi metionin, međutim u uvjetima oksidacijskog stresa ili infekcije učestalost misacilacije metioninom se povećava za oko 10%.^[14] Istraživanje provedeno na ljudskim stanicama pokazalo je da u uvjetima oksidacijskog stresa ERK1/2 kinaza fosforilira enzim metionil-tRNA-sintetazu (MetRS) na dva aminokiselinska ostatka (Ser209 i Ser825). Ovakav enzim pokazuje veću sklonost da veže metionin na tRNA molekule namijenjene za druge aminokiseline što rezultira proteinima bogatim metioninom (slika 11). U konačnici ova promjena smanjila je oksidacijsku štetu i umiranje stanica *in vitro*.^[17] Metionin je povoljan izbor za obranu od ROS-ova jer se može reverzibilno oksidirati i reducirati pomoću enzima peptidil-Met-sulfoksid-reduktaza (slika 12). U obrani protiv akutnog oksidacijskog stresa također je bitno vrijeme. Već je rečeno da kada se stanica nađe pod utjecajem ROS-ova aktiviraju se putevi signala koji potiču transkripciju RNA i sintezu novih proteina, no u stanicama sisavaca ovaj proces traje nekoliko sati dok se obrt aminoaciliranih tRNA događa na razini sekundi, zato je misacilacija metioninom odličan inicijalni odgovor jer se brzo sintetiziraju proteini otporniji na ROS-ove.^[14]

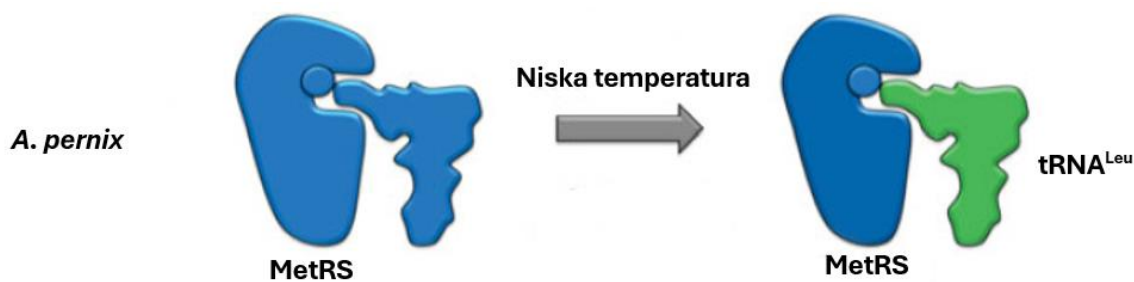


Slika 11. Shematski prikaz misacilacije kod sisavaca uslijed modifikacija MetRS enzima. (Preuzeto i prilagođeno: M. H. Schwartz, T. Pan, Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts, 2016.)



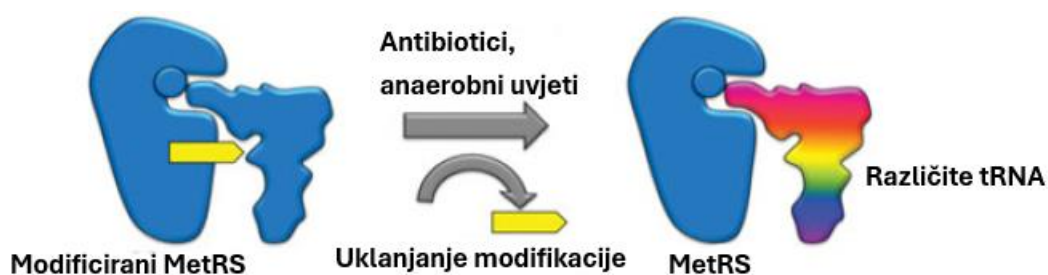
Slika 12. Reakcijska shema reverzibilne oksidacije i redukcije metionina. (Preuzeto iz T. Pan, Adaptive Translation as a Mechanism of Stress Response and Adaptation, *Annual Review of Genetics*, **47**, 2013.)

Aeropyrum pernix je ekstremofilna arheja koja živi u blizini hidrotermalnih izvora na temperaturama od 70°C do 90°C, međutim optimalna temperatura za život joj je 90°C. Kada se pri toj temperaturi uzgaja u laboratoriju ne primjećuje se misacilacija metioniom, no ako se ovaj organizam uzgaja na 75°C učestalost zamjene leucina metioniom znatno poraste (slika 13). Pretpostavlja se da uvođenje metionina na mjesto leucina potiče konformacijsku fleksibilnost enzima i čuva enzimsku aktivnost i pri nižim temperaturama. U prilog ovom zaključku ide činjenica da se aktivnost citrat-sintaze mistranslatirane pri nižoj temperaturi smanjuje kada je enzim izložen višim temperaturama.^[18]



Slika 13. Shematski prikaz misacilacije metioninom kod arheje *A. pernix* uslijed izlaganja organizma niskim temperaturama. (Preuzeto i prilagođeno: M. H. Schwartz, T. Pan, Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts, 2016.)

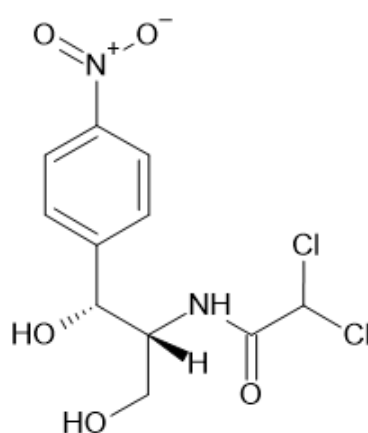
E. coli povećava učestalost mistranslacije metioninom kada živi u anaerobnim uvjetima ili je izložena antibioticima. U optimalnim uvjetima *E. coli* će nastojati spriječiti mistranslaciju metioninom uvođenjem posttranslacijskih modifikacija u vidu sukcinilacije dva aminokiselinska ostatka lizina u MetRS enzimu (Lys362 i Lys388). Te modifikacije ostvaruju interakcije sa tRNA i osiguravaju točnije raspoznavanje. S obzirom da su molekule tRNA negativno nabijene moguće je da pozitivno nabijeni bočni ogranci lizina stabiliziraju vezanje tRNA sa MetRS i smanjuju specifičnost dok negativno nabijena karboksilna skupina sukcinila povećava specifičnost. (slika 14)



Slika 14. Shematski prikaz misacilacije kod *E. coli* uslijed izlaganja organizma antibioticima ili anaerobnim uvjetima. (Preuzeto i prilagođeno: M. H. Schwartz, T. Pan, Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts, 2016.)

Ova modifikacija simulirana je u bakterijama *E. coli* uvođenjem mutacija na MetRS enzime tako da se umjesto ključnih lizina u njih ugrađuje glutamat. Kao i sukcinat, glutamat ima

negativnu terminalnu karboksilnu skupinu pa tako imaju sličan efekt na djelovanje enzima odnosno on postaje visoko specifičan u svim uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Kod divljeg tipa uzgajanog u anaerobnim uvjetima zamijećena je češća misacilacija metioninom nego kod mutanta koji je umjesto lizina nosio glutamat, a mutanti koji su provodili točniju translaciju pokazivali su manju otpornost na antibiotike kao što je kloramfenikol (slika 15). Kako se mistranslatirani proteini mogu razlikovati po svojim svojstvima bit će u različitoj mjeri podložni kemijskim stresorima jer će s njima ostvarivati drugačije interakcije. Poželjno je da stanica ima ovakvu raznolikost proteina jer povećava šanse da će pod raznim uvjetima stresa oni ostati funkcionalni.^[19]



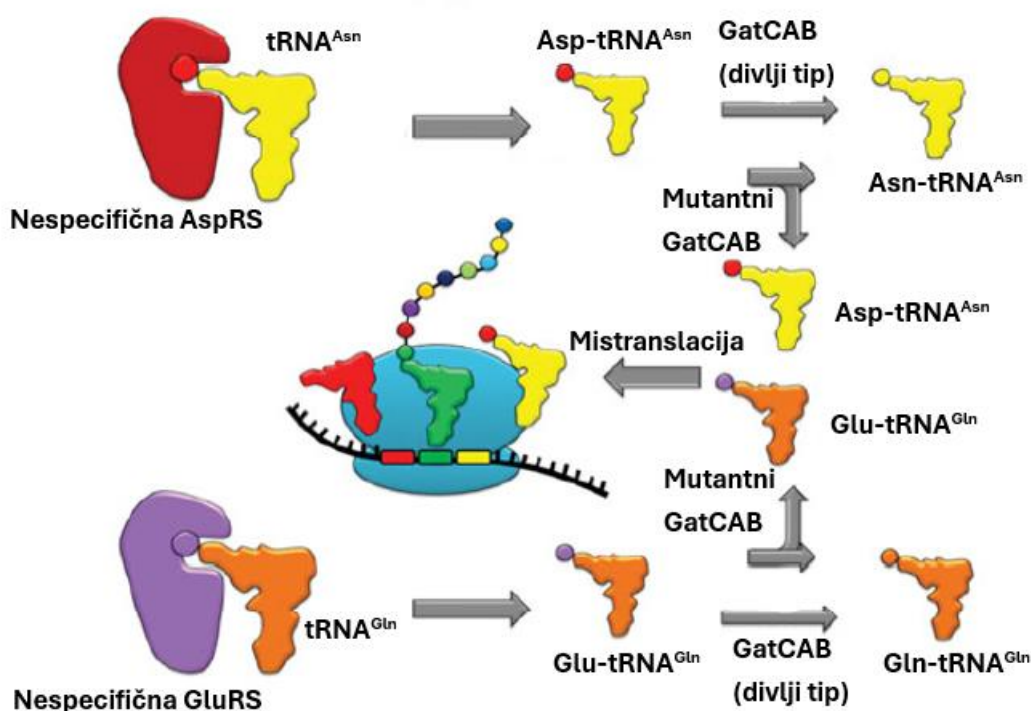
Slika 15. Strukturna formula kloramfenikola. (preuzeto sa

<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5744.html> - Datum pristupa: 30. kolovoza 2024.)

2.3.5. Utjecaj mistranslacije na otpornost na antibiotike

Mnogi antibiotici djeluju na način da ometaju translaciju kod bakterija, što mogu postići remećenjem okvira čitanja, sprječavanjem prepoznavanja STOP kodona, sprječavanjem otpuštanja polipeptidnog lanca s ribosoma ili ometanjem prijenosa polipeptidnog lanca tijekom translacije kao ranije spomenuti kloramfenikol.^[1,21]

Ranije je opisan specifičan mehanizam aminoaciliranja tRNA kod nekih bakterija poput *M. tuberculosis*. Ako se enzimski kompleks GatCAB umjetno utiša uvođenjem mutacija dolazi do povećanja učestalosti mistranslacije (slika 16) jer manje aktivan GatCAB kompleks znači da se zamjena aspartata asparaginom na Asp-tRNA^{Asn} i zamjena glutamata glutaminom na Glu-tRNA^{Gln} događa u manjoj mjeri. No, pokazalo se da ove promjene povoljno utječu na otpornost uzročnika tuberkuloze na antibiotik rifampicin.^[20]



Slika 16. Shematski prikaz misacilacije kod *M. tuberculosis* uslijed izlaganja organizma antibioticima ili anaerobnim uvjetima. (Preuzeto i prilagođeno: M. H. Schwartz, T. Pan, Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts, 2016.)

Rifampicin (slika 17) djeluje tako što stvara interakcije sa β -podjedinicom RNA-polimeraze i narušava njezinu aktivnost. Kada se događaju zamjene ovih aminokiselina stanica dobiva velik broj istih proteina, npr. RNA-polimeraza, koji se razlikuju samo po tome što na različitim mjestima imaju glutamat umjesto glutamina i aspartat umjesto asparagina. Pretpostavka je da ove zamjene narušavaju interakcije između antibiotika i RNA-polimeraze što enzim čini više otporan na antibiotik.^[20] Moguće rješenje ovog problema otpornosti *M. tuberculosis* na rifampicin je primjena aminoglikozida kasugamicina. Istraživanja na zaraženim miševima pokazala su da on povećava točnost translacije tako što smanjuje učestalost ugrađivanja pogrešnih aminokiselina na ribosomu *M. tuberculosis in vivo* i *in vitro* čime se smanjuje otpornost na rifampicin.^[21]

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. A. L. Lehninger, D. L. Nelson i M. M. Cox, *Principles of Biochemistry (4th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2004., 1034-1068.
2. Albert L. Lehninger, David L. Nelson i Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry (8th edition)*, W. H. Freeman and company, New York, 2021. str. 3520, 3526.
3. M. H. Schwartz, T. Pan, Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts, 2016.
4. N. Nair †, H. Raff †, M. T. Islam, M. Feen, D. M. Garofalo, K. Sheppard, The *Bacillus subtilis* and *Bacillus halodurans* Aspartyl-tRNA Synthetases Retain Recognition of tRNA^{Asn}, *Journal of Molecular Biology* **3**, 428, 2016, 618-630.
5. Su, HW., Zhu, JH., Li, H. *et al.* The essential mycobacterial amidotransferase GatCAB is a modulator of specific translational fidelity. *Nat Microbiol* **1**, 16147, 2016.
6. J. Lee, K. BeeBe, L. Nangle *et al.* Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* **443**, 2006, 50–55.
7. J. Lu, M. Bergert, A. Walther *et al.* Double-sieving-defective aminoacyl-tRNA synthetase causes protein mistranslation and affects cellular physiology and development. *Nat Commun* **5**, 5650, 2014.
8. B. Ruan, S. Paliouraa, J. Sabinaa, *et al.* Quality control despite mistranslation caused by an ambiguous genetic code, *PNAS*, **105**, 43, 2008, 16502-16507.
9. N. M. Reynolds, J. Ling *et al.* Cell-specific differences in the requirements for translation quality control, *PNAS*, **107**, 9, 2010, 4063-4068.
10. M. Raina, A. Moghal, A. Kano *et al.* Reduced Amino Acid Specificity of Mammalian Tyrosyl-tRNA Synthetase Is Associated with Elevated Mistranslation of Tyr Codons, *Journal of biological chemistry*, **25**, 298, 2014, 7780-17790.
11. J. Ling and D. Söll, Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site, *PNAS*, **107**, 9, 2010, 4028-4033.
12. <https://elifesciences.org/articles/02501> (datum pristupa: 20. kolovoz 2024.)
13. L. Li, M. T. Boniecki, J. D. Jaffe *et al.* Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in *Mycoplasma* parasites, *PNAS*, **108**, 23, 2011, 9378-9383.

14. T. Pan, Adaptive Translation as a Mechanism of Stress Response and Adaptation, *Annual Review of Genetics*, **47**, 2013 139–55.
15. I. Miranda, A. Silva-Dias, R. Rocha *et al.* Candida albicans CUG Mistranslation Is a Mechanism To Create Cell Surface Variation, *ASM Journals*, **4**, 4, 2013.
16. Y. Fan, L. Thompson, Z. Lyu *et al.* Optimal translational fidelity is critical for Salmonella virulence and host interactions, *Nucleic Acids Research*, **10**, 47, 2019, 5356–5367.
17. J. Y. Lee, D. G. Kim, B. Kim *et al.* Promiscuous methionyl-tRNA synthetase mediates adaptive mistranslation to protect cells against oxidative stress, *Journal of Cell Science*, **127**, 19, 2014, 4234–4245.
18. M. H. Schwartz, T. Pan, Temperature dependent mistranslation in a hyperthermophile adapts proteins to lower temperatures, *Nucleic Acids Research*, **1**, 44, 2016, 294–303.
19. M. H. Schwartz, J. R. Waldbauer, L. Zhang, T. Pan, Global tRNA misacylation induced by anaerobiosis and antibiotic exposure broadly increases stress resistance in Escherichia coli, *Nucleic Acids Research*, **21**, 44, 2016, 10292–10303.
20. B. Javid, F. Sorrentino, M. Toosky *et al.* Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance, *PNAS*, **111**, 3, 2013, 1132-1137.
21. Z. Lyu, C. Wilson, J. Ling, Translational Fidelity during Bacterial Stresses and Host Interactions, *Pathogens* **12**, 3, 2023, 383.
22. <https://elifesciences.org/articles/36782> (datum pristupa: 22. kolovoz 2024.)
23. <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5744.html> (Datum pristupa: 30. kolovoza 2024.)
24. <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10468813.html> (Datum pristupa: 30. kolovoza 2024.)