

# Elongacijski faktor Tu kao moonlighting protein

---

**Tintor, Erna**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:217:266556>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Elongacijski faktor Tu kao *moonlighting* protein

Elongation factor Tu as a moonlighting protein

SEMINARSKI RAD

Erna Tintor

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate Study of Molecular Biology

Mentorica: prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2020.

**Popis kratica:**

aa-tRNA – aminoacilirana transportna RNA

CD21 – eng. *cluster of differentiation*; receptor komplementa

DC – eng. *dendritic cells*; dendritičke stanice

EF – elongacijski faktor

EFR – receptor proteina EF-Tu

EF-Tu – eng. *elongation factor thermo unstable*: termostabilan elongacijski faktor

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GDP – gvanozin difosfat

GDPNP – gvanilil imidofosfat

GTP – gvanozin trifosfat

MscL – eng. *large conductance mechanosensitive ion channel*; veliki mehanosenzitivni kanal

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NTHi – eng. *nontypeable Haemophilus influenzae*; netipabilna bakterija *Haemophilus influenzae*

OmpW – eng. *outer membrane protein W*; protein W vanjske membrane

OprF – eng. *outer membrane porin F*; porin F vanjske membrane

PAMP – eng. *pathogen-associated molecular patterns*; molekularni obrasci patogenih mikroorganizama

PGI – eng. *phosphoglucose isomerase*; fosfoglukoza izomeraza

PPI – protein-protein interakcije

PRR – eng. *pattern recognition receptor*; receptor za prepoznavanje molekularnih obrazaca

PTI – eng. *PAMP-triggered immunity*; imunost izazvana PAMP-om

RNA – ribonukleinska kiselina

SLiMs – eng. *short linear motifs*; kratki linearni motivi

TLR – eng. *Toll-like receptor*; receptor sličan Toll-u

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
2. SVEPRISUTNOST <i>MOONLIGHTING</i> PROTEINA .....	2
2.1. Eukariotski <i>moonlighting</i> proteini .....	2
2.2. Arhejski <i>moonlighting</i> proteini.....	3
2.3. Virusni <i>moonlighting</i> proteini .....	3
3. <i>MOONLIGHTING</i> PROTEINI U BAKTERIJAMA .....	3
4. STRUKTURA I KANONIČKA ULOGA <i>MOONLIGHTING</i> PROTEINA EF-Tu.....	4
4.1. Evolucija proteina EF-Tu .....	4
4.2. Struktura proteina EF-Tu.....	5
4.3. Reakcijski mehanizam proteina EF-Tu .....	5
5. <i>MOONLIGHTING</i> ULOGE PROTEINA EF-Tu .....	6
5.1. Protein EF-Tu kao receptor tvari P .....	7
5.1.1. Izlazak proteina EF-Tu na staničnu površinu .....	7
5.1.2. Sekundarna struktura proteina EF-Tu u ulozi receptora tvari P.....	7
5.2. Protein EF-Tu u interakciji s imunološkim sustavom .....	8
5.2.1. Protein EF-Tu kao molekula PAMP u biljaka .....	9
5.2.2. Imunološki odgovor životinja na protein EF-Tu .....	10
5.3. Uloga proteina EF-Tu u bakterijskoj adheziji .....	11
5.3.1. Procesiranje proteina EF-Tu na površini bakterija .....	12
5.4. Oblik stanice .....	13
6. ZAKLJUČAK .....	15
7. LITERATURA .....	16
8. SAŽETAK.....	20
9. SUMMARY .....	21

## 1. UVOD

Proteini su iznimno važne makromolekule zadužene za izvršavanje velikog broja različitih funkcija unutar i izvan stanice. Aminokiselinski slijed, razne modifikacije i mnogi drugi faktori čine jedan protein specijaliziran za točno određenu zadaću. Bar se tako mislilo sve dok se nisu počeli otkrivati određeni proteini koji su se mogli zateći kako obavljaju potpuno različit zadatak od onog za kojeg se u početku znalo (Nelson i Cox, 2012).

Funkcija proteina može se definirati tako da se podijeli na neke razine. Primjerice, enzimi su velika skupina proteina i oni kataliziraju kemijske reakcije, a njih ima jednako toliko pa i više nego reakcija koje zahtijevaju katalizator. Kada se pogleda detaljnije, enzimi imaju različite reakcijske mehanizme, što znači da na različit način ostvaruju interakcije s drugim tvarima - supstratima. I naposljetku, svaki enzim ima točno određeni supstrat kojeg može vezati u svoje aktivno mjesto. Tako svaki protein ima svoju opisanu primarnu funkciju, no postoje i proteini koje imaju različite domene te tako mogu vršiti više uloga (Nelson i Cox, 2012).

Krajem 80-ih godina prošlog stoljeća, u patkama je opisan gen koji kodira protein s dvije potpuno različite uloge: kristalin u leći oka i sveprisutni enzim laktat dehidrogenazu. Budući da taj protein nije nastao kao posljedica alternativnog prekrajanja molekule ribonukleinske kiseline (RNA), posttranslacijskih modifikacija proteina ili fuzije gena, ta pojava je nazvana 'dijeljenje gena' (eng. *gene sharing*), (Piatigorsky i Wistow, 1989). Daljnjim istraživanjima kristalini su i u drugim životinjama prepoznati kao proteini s različitim sekundarnim funkcijama (Piatigorsky, 1992). Narednih godina otkrilo se još nekoliko proteina sličnih osobina koji su bili opisivani na razne načine (Henderson i sur., 2016), no nije im se pridavala osobita važnost. Ovakva aktivnost proteina je prvi puta opisana kao '*moonlighting*' u radu iz 1995. godine koji opisuje uloge somatostatina i somatokrinina kao imunoloških modulatora (Campbell i Scanes, 1995). Međutim, tek je znanstvenica Constance Jeffery prepoznala njihovu važnost u razumijevanju kompleksnosti stanice i složenosti genoma, te ih predstavila pod nazivom *moonlighting* proteini (Jeffery, 1999).

Pojam '*moonlighting*' opisuje proteine koji unutar jednog polipeptidnog lanca obavljaju više od jedne fiziološki značajne funkcije (Jeffery, 1999). Ova skupina proteina isključuje proteolitičko cijepanje proteina ili prekrajanje molekule RNA. Također, *moonlighting* aktivnost proteina razlikuje se od bifunkcionalnosti ili promiskuitetnosti, što su dva pojma prvenstveno rezervirana za enzime. Bifunkcionalan enzim uglavnom ima različite domene koje su

specijalizirane za različite aktivnosti, dok promiskuitetan enzim ima aktivno mjesto koje može katalizirati različite reakcije i sa različitim supstratima (Gupta i sur., 2011).

Ovaj rad kratak je pregled saznanja o *moonlighting* proteinima s naglaskom na bakterijske proteine i svestranost termonestabilnog ribosomskog elongacijskog faktora (eng. *elongation factor thermo unstable Tu*, EF-Tu) u bakterijama.

## **2. SVEPRISUTNOST MOONLIGHTING PROTEINA**

*Moonlighting* proteini mogu se naći u sve tri domene života: eukariotima, arhejama i bakterijama, no prisutni su i u virusima (Jeffery, 2017). U kvascima ih je konkretno zabilježeno najviše, vjerojatno zbog toga što su u njima opsežno istraženi (Gancedo i Flores, 2008). Kao što je već navedeno, prvi *moonlighting* protein pronađen je upravo u pticama i spada u skupinu dobro poznatih metaboličkih proteina (Piatigorsky i Wistow, 1989), što je zanimljivo vrlo česta pojava u svijetu *moonlighting* proteina (Henderson i Martin, 2011).

### **2.1. Eukariotski *moonlighting* proteini**

U eukariotima je opisano preko stotinu *moonlighting* proteina i nerijetko se isti proteini u različitim organizmima nađu u toj ulozi. Fosfoglukoza izomeraza (eng. *phosphoglucose isomerase*, PGI), esencijalan je glikolitički enzim i za njega je pronađeno nekoliko *moonlighting* funkcija u različitim eukariotima. Humana PGI može inducirati sazrijevanje mijeloidnih stanica, što potencijalno igra ulogu u pojavi leukemije (Xu i sur., 1996), dok u jednoj vrsti afričkog tvora (*Mustela nigripes*) protein PGI pak ima ulogu u poticanju implantacije embrija (Schulz i Bahr, 2004). Nedavno istraživanje pokazalo je da čak i kad je humani enzim PGI mutiran u kulturi, tako da nema primarnu kinaznu funkciju, svejedno može obavljati *moonlighting* funkciju kao faktor rasta kojeg proizvode stanice raka (Yanagawa i sur., 2005). Mnogo enzima ciklusa limunske kiseline također pokazuju *moonlighting* aktivnost, primjerice enzim akonitaza (Henderson i Martin, 2011). Njena funkcija u regulaciji metabolizma željeza kod ljudi je dobro istražena i zabilježeno je kako se akonitaza veže na ukosnice feritinske glasničke RNA ili veže željezo ovisno njegovoj koncentraciji u stanici (Philpott i sur., 1994).

## 2.2. Arhejski *moonlighting* proteini

Unatoč tome što je pronađeno mnogo multifunkcionalnih proteina u arhejama, *moonlighting* proteini u ovoj skupini organizama su malo manje zastupljeni nego u eukariotima. Jedan od prvih radova opisuje *moonlighting* uloge šaperona, proteina koji inače sudjeluju pravilnom smatanju drugih proteina. U arheji *Sulfolobus shibatae* šaperon HSP60 (eng. *heat shock protein 60*) ima ulogu u formiranju unutarstaničnog citoskeleta (Trent i sur., 1997). U radu Jia i sur. (2013) opisano je nekoliko novijih proteina arheja za koje su ustanovljene *moonlighting* funkcije, među kojima je enzim nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) oksidaza koja sudjeluje u regulaciji oksidacijskog stresa u stanicama. Oligomerizacijom podjedinica, NADH oksidaza arheja *Thermococcus profundus* i *T. kodakarensis* može djelovati kao induktor apoptoze. Smatra se da i glikolitički enzimi arheja također imaju sposobnost izvođenja *moonlighting* uloga i da je broj *moonlighting* proteina veći nego što ih je trenutno otkriveno, no manjak spoznaja o njima vjerojatno je uzrokovan ograničenim brojem istraživanja te težim metodama kultivacije arheja i analize njihovog genoma (Jia i sur., 2013).

## 2.3. Virusni *moonlighting* proteini

O virusnim *moonlighting* proteinima je jako malo saznanja, međutim poznato je kako neki glikoproteini na virusnoj ovojnici imaju *moonlighting* funkcije. Glikoproteini sudjeluju u pričvršćivanju virusa za stanicu domaćina i kataliziranju fuzije membrane virusa i stanične membrane domaćina, no igraju ulogu i u izbjegavanju imunološkog odgovora (Banerjee i Mukhopadhyay, 2016). Jedan primjer je glikoprotein ovojnice Ebola virusa koji može biti otpušten ili izlučen s površine virusa i kompetitivno se vezati na neutralizirajuća antitijela na Ebola virus. Glikoproteini ovojnice Ebola virusa na taj način onesposobljavaju antitijela da prepoznaju virus kao patogen i tako spriječe infekciju (Cook i Lee., 2013).

## 3. MOONLIGHTING PROTEINI U BAKTERIJAMA

Uloga *moonlighting* proteina često ovisi o njihovoj lokaciji u stanici pa se tako u velikoj zastupljenosti među njima mogu naći citosolni proteini koji se u određenim okolnostima pojavljuju na površini stanice i tamo obnašaju različite uloge. Takvi proteini veoma su prisutni u bakterijama i zanimljivo je da se među njima često mogu naći *housekeeping* proteini, koji sudjeluju u esencijalnim staničnim procesima, primjerice ciklusu limunske kiseline ili metabolizmu proteina i molekule deoksiribonukleinske kiseline, DNA (Jeffery, 2017).

Prvi otkriveni bakterijski *moonlighting* protein je gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) iz bakterije *Streptococcus pyogenes*. GAPDH je citosolni enzim glikolitičkog puta koji katalizira konverziju gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat, no pokazalo se da se može naći na površini stanice i tamo vezati razne ligande (Pancholi i Fischetti, 1992).

Početakom 21. stoljeća krenule su opsežne analize bakterijskog proteoma kako bi se otkrilo koliko je uistinu prisutan taj fenomen ispoljavanja citosolnih proteina na staničnoj površini u kontekstu provođenja *moonlighting* funkcija. Samo u streptokokima je pronađeno preko 30 takvih proteina i oni su se razlikovali između podvrsta bakterija. Pregledom do sada provedenih istraživanja o *moonlighting* proteinima streptokoka, ustanovljeno je da se svi enzimi glikolitičkog puta tih bakterija mogu naći na površini njihovih stanica, što dovodi u pitanje može li se glikoliza odvijati izvan stanice i imaju li možda neki međuprodukti glikolize ulogu u staničnoj signalizaciji. Takvo otkriće bi moglo opisati glikolizu kao prvi *moonlighting* put (Henderson i Martin, 2011).

#### **4. STRUKTURA I KANONIČKA ULOGA MOONLIGHTING PROTEINA EF-Tu**

Sinteza proteina odvija se na ribosomima i taj proces se sastoji od tri glavne faze: inicijacije, elongacije i terminacije sinteze. Inicijaciji prethodi aktivacija aminokiselina, a poslije terminacije slijedi procesiranje produkta kako bi se u konačnici dobio funkcionalan protein. Tijekom elongacije događa se najvažniji korak sinteze proteina: stvaranje peptidne veze između aminokiselina. Taj proces kataliziran je u peptidnom transferaznom centru, gdje glavnu ulogu ima ribonukleinska kiselina 23S (23S RNA), ali u sam proces je uključeno i nekoliko proteina zvanih elongacijski faktori (EF). Elongacijski faktori su topljivi citosolni proteini i u bakterijskim stanicama ih ima četiri, a jedan od njih je elongacijski faktor Tu, koji pripada među najzastupljenije proteine u bakterijama. Veličine je oko 43 kDa i njegova glavna uloga je donositi aminoacilirane transportne RNA (aa-tRNA) na ribosom (Nelson i Cox, 2012).

U eukariotima se protein EF-Tu nalazi u mitohondrijima i plastidima, upravo zbog njihovog prokariotskog porijekla, dok je citosolni analog protein eEF-1 $\alpha$  sličan arhejskom aEF- $\alpha$  (Negrutskii i El'skaya, 1998).

##### **4.1. Evolucija proteina EF-Tu**

Protein EF-Tu kodiran je genom *tuf*, čije se sekvence s preko 50% homologije poklapaju u velikom broju prokariota koji nisu genetički povezani, što ukazuje na to da je taj gen visoko konzerviran. U usporedbi s genima za primjerice ribosomsku RNA, za koje je poznato da su



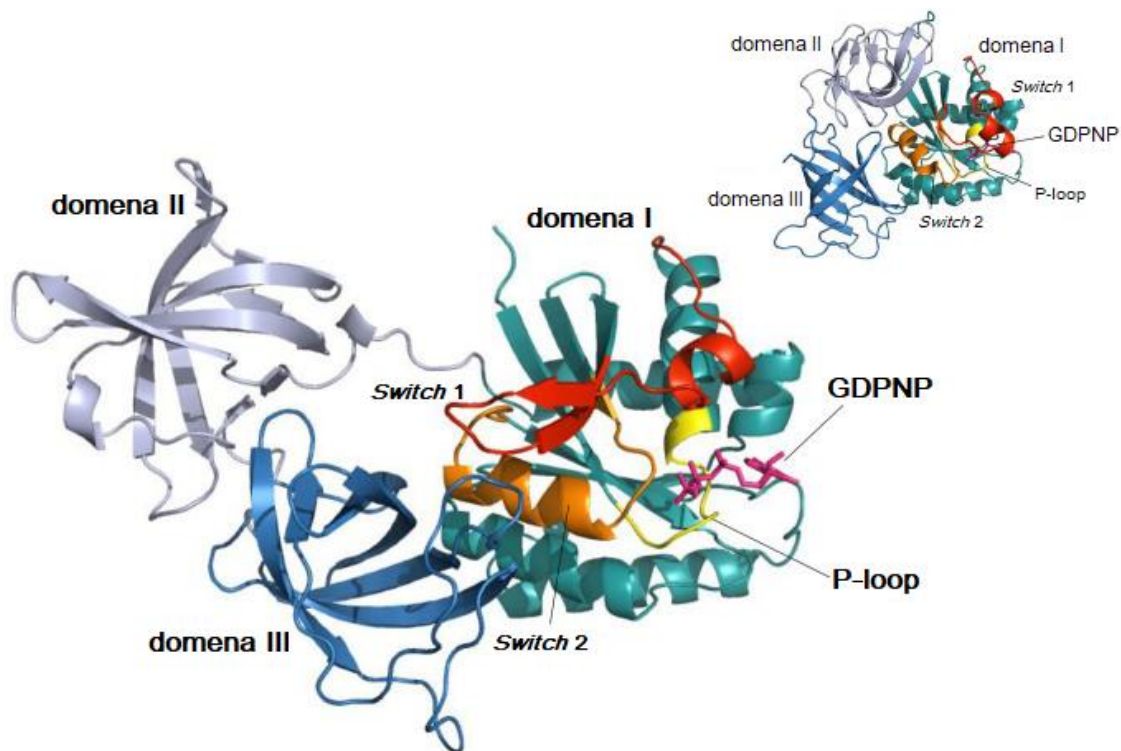
visoko konzervirani, gen *tuf* pokazuje još veću homologiju među vrstama (Filer i Furano, 1980). Također, mnoge enterobakterije sadrže dvostruke kopije gena *tuf* (*tufA* i *tufB*), koje imaju izrazito visoku homologiju, i delecija jednog od njih u većini slučajeva neće imati letalni učinak na stanicu. U kanoničkoj ulozi, protein EF-Tu se primarno prepisuje i prevodi s gena *tufA* (Lathe i Bork, 2001).

## 4.2. Struktura proteina EF-Tu

Protein EF-Tu je G-protein, što znači da veže gvanozin trifosfat (GTP) i gvanozin difosfat (GDP) te ima GTP-aznu aktivnost. Ovaj protein čine tri strukturne domene: N-terminalna domena I, domena II i C-terminalna domena III (Slika 1.). Domena I (G-domena) građena je od šest  $\beta$ -ploča okruženih sa sedam  $\alpha$ -zavojnica, sadrži nukleotid-vezujuću regiju i GTP-azni centar. G-domena predstavlja katalitički centar proteina EF-Tu i najkonzerviranija je domena proteina EF-Tu među bakterijama. Domene II i III građene su od šest  $\beta$ -ploča i one vežu oligonukleotide, no sve su tri domene potrebne za stvaranje aa-tRNA veznog mjesta (Šanderová i sur., 2004). Između domena I i II čvrsto sjeda 3'-kraj tRNA, T-omča tRNA je u interakciji s domenom III, dok je 5'-kraj u kontaktu spoja sve tri domene (Negrutskii i El'skaya, 1998). Osim GTP-a, važan ligand je i ion  $Mg^{2+}$ , koji ima ulogu stabiliziranja GTP-a u veznom mjestu time što koordinira njegove fosfatne skupine. Za dobivanje kristalne strukture, umjesto GTP-a u aktivnom mjestu se postavlja njegov nehidrolizabilni analog 5'-gvanozin imidodifosfat (GDPNP).

## 4.3. Reakcijski mehanizam proteina EF-Tu

Kada je na protein EF-Tu vezana molekula GTP-a, sve tri domene kompaktno su posložene u zatvorenu konformaciju, gdje postoji visoki afinitet vezanja aa-tRNA. Kada dolazi do prepoznavanja kodona i antikodona, u G-domeni se događa hidroliza GTP-a uz pomoć stabilizacije fosfat-vezujućim okretom (*P-loop*) i koordiniranjem fosfatnih skupina s iona  $Mg^{2+}$ . To uzrokuje strukturne promjene regija *switch 1* i *switch 2* iz domene I, koje oslabljuju interakciju regije *switch 2* s domenama II i III, što dovodi do rotiranja domene I za oko  $90^\circ$  u odnosu na druge dvije domene (Johansen i sur., 2018). Takva velika konformacijska promjena prilikom koje se domene djelomično odvajaju, otvara strukturu proteina EF-Tu i smanjuje afinitet vezanja aa-tRNA, koja se zatim otpušta s proteina. Izmjenu GDP/GTP u prokariotima izvršava termostabilni elongacijski faktor (eng. *elongation factor thermo stable*, EF-Ts) preko interakcije s domenom III proteina EF-Tu (Alberts i sur., 2002).



**Slika 1.** Otvorena struktura proteina EF-Tu s analogom GDPNP umjesto GTP-a. Regije su prema bojama označene na sljedeći način: Domena I (ak 1-200) plave boje, osim regije *switch 1* (crveno), regije *switch 2* (narančasto) i regije P-loop (žuto). Domena II (ak 201-300) je sive boje, a domena III (ak 301-393) tamnoplave boje. GDPNP je prikazan modelom štapića. U gornjem desnom kutu se za usporedbu nalazi prikaz zatvorene konformacije proteina EF-Tu (PDB: 1OB2). Preuzeto i prilagođeno iz Johansen i sur., 2018.

## 5. MOONLIGHTING ULOGE PROTEINA EF-Tu

Proteini koji su namijenjeni za život na staničnoj površini uglavnom na amino-kraju posjeduju signalni dio molekule koji prepoznaju transportni proteini i prenose ih kroz lipidnu membranu. Međutim, za elongacijske faktore i prokariota i eukariota pronađeno je kako izvode razne funkcije na staničnoj površini unatoč tome što su primarno citosolni proteini i nemaju signalnu sekvencu za transport na staničnu površinu (Green i Mecsas, 2016). Osim toga, ako se citosolni protein nađe na površini stanice, to je većinom znak za njenu lizu (Harvey i sur., 2019). Kao *moonlighting* protein, EF-Tu je prvi puta opisan na staničnoj površini bakterije *Mycoplasma pneumoniae*, gdje ima funkciju vezanja fibronektina (Dallo i sur., 2002), a danas

je sve više saznanja o njegovim svestranim funkcijama na površini bakterijske stanice, ali i unutar citosola.

## **5.1. Protein EF-Tu kao receptor tvari P**

Tvar P je mali neuropeptid iz skupine tahikinina koji se izlučuje na površini ljudske kože i odgovoran je za osjet spore i trajne boli, ali i vazodilataciju kapilara (Hall, 2017). U prisutnosti tvari P, protein EF-Tu nekih bakterija kožne mikroflore može se ponašati kao njegov receptor i ta interakcija je detaljno istražena.

### **5.1.1. Izlazak proteina EF-Tu na staničnu površinu**

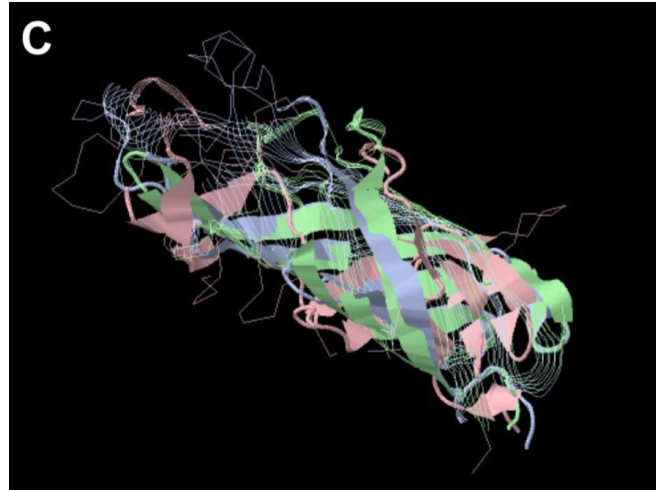
Nakon izlaganja bakterijskih stanica tvari P, protein EF-Tu je pronađen na površini bakterija obilježavanjem antitijelima. EF-Tu je velik protein zbog čega zahtijeva prisutnost transportera kako bi prošao kroz staničnu membranu i dokazano je da su veliki membranski mehanosenzitivni kanali (eng. *large conductance mechanosensitive ion channel*, MscL) odgovorni za taj prijelaz. Kanali MscL se mogu inhibirati dodatkom gadolinijevog klorida (GdCl<sub>2</sub>) čime se sprječava transport proteina EF-Tu na površinu. Također, inhibicija kanala MscL dodatkom GdCl<sub>2</sub> u bakterijama *Bacillus cereus*, koje su tretirane s tvari P, znatno smanjuje mogućnost stvaranja biofilma i citotoksičnost bakterija. Ta činjenica predviđa da protein EF-Tu kao receptor tvari P ima ulogu u adheziji bakterija i njihovoj patogenosti (N'Diaye i sur., 2019).

### **5.1.2. Sekundarna struktura proteina EF-Tu u ulozi receptora tvari P**

Protein EF-Tu je u kanoničkoj ulozi globularni protein, no može se razmotati u izduženiji oblik, te oba oblika pokazuju približno jednaku raspodjelu energije i stabilnost. Molekularnim modeliranjem pokazalo se da domene II i III stvaraju dvije hidrofobne β-bačve koje se s velikim strukturnim poklapanjem mogu usporediti s transmembranskim regijama porina vanjske membrane kao što su OmpW (eng. *outer membrane protein W*) i OprF (eng. *outer membrane porin F*) (Slika 2.). To znači da se protein EF-Tu najvjerojatnije veže za staničnu membranu uz pomoć interakcija upravo tih dviju domena.

Protein EF-Tu i prirodni receptor tvari P (neurokinin 1) ne dijele homologne sekvence niti strukturnu sličnost, no pretpostavlja se da su domene I i II receptorski dio proteina i da vežu polarni (N-terminalni) kraj tvari P. Budući da je tvar P peptid koji zbog svoje građe ne može

prijeći bakterijsku membranu, moguće je da stvara pore kroz interakciju s proteinom EF-Tu te na taj način ulazi u stanicu (N'Diaye i sur., 2019).



**Slika 2.** Domene II i III proteina EF-Tu koje tvore dvije hidrofobne bačve u poklapanju s transmembranskim regijama proteina OmpW i OprF. Preuzeto i prilagođeno iz N'Diaye i sur., 2019.

## 5.2. Protein EF-Tu u interakciji s imunološkim sustavom

Biljke i životinje razvile su imunološki odgovor kako bi se borile protiv mikroorganizama te tako postoje određeni sustavi prepoznavanja koji ga mogu potaknuti. Dokazano je da protein EF-Tu može izazvati imunološki odgovor u sisavcima, što se može detektirati povećanjem razine raznih antitijela i citokina. Kod životinja općenito postoje razni mehanizmi prepoznavanja proteina EF-Tu, ali poznato je da i biljke reagiraju na EF-Tu kao na induktor imunološkog odgovora. Za razliku od životinja, gdje to još nije objašnjeno u svim slučajevima, u biljkama se aktivacija uvijek događa preko receptora za prepoznavanje molekularnih obrazaca (eng. *pattern recognition receptors*, PRR).

Važnu ulogu aktivatora tu igraju molekularni obrasci patogenih mikroorganizama (eng. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) koje primarno prepoznaju stanični receptori PRR. Receptori PRR mogu se naći na površini stanice, no i u fagocitnim vezikulama ili citosolu (Abbas i sur., 2018), a jednu veliku skupinu membranskih receptora čine receptori slični Tollu (eng. *toll-like receptors*, TLR) koji prepoznaju petidoglikane, lipopolisaharide i ostale molekule patogena.

### 5.2.1. Protein EF-Tu kao molekula PAMP u biljaka

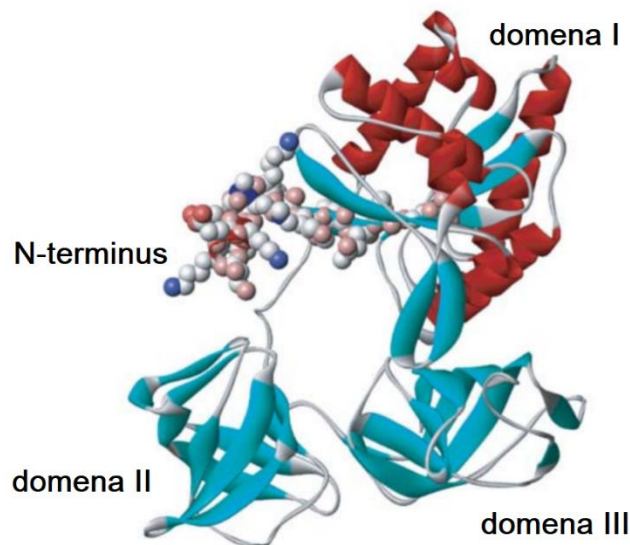
Protein EF-Tu je vrlo konzerviran, no među biljkama postoje razlike u odnosu na to koje regije proteina EF-Tu će se prepoznati kao molekule PAMP. U prvom koraku obrane dolazi do proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, kaloznih naslaga ili programiranje stanične smrti - imunost izazvana PAMP-om (eng. *PAMP-triggered immunity*, PTI). Ako bakterije ispuste određene efektore, onda je onemogućen imunološki odgovor, no biljke su razvile drugu obrambenu razinu time što mogu proizvoditi R proteine efektorski stečene imunosti (Ezzat i sur., 2014).

Jedan od prvih radova na ovu temu opisuje protein EF-Tu kao induktor imunološkog odgovora u biljkama roda *Arabidopsis* koje prepoznaju N-acetilirani peptid N-terminalnog kraj proteina koji je visoko konzerviran. Kao odgovor na prepoznavanje patogena, u biljkama može doći do hipersenzitivne reakcije, koja je uzrokovana izlaskom iona  $K^+$  iz stanice i ulaskom iona  $H^+$  u stanicu. Takva izmjena iona dovodi do sniženja pH u vakuolarnoj tekućini i povišenja pH (alkalizacije) izvan stanice (Atkinson i sur., 1985). Izvanstanična alkalizacija je i reakcija biljaka roda *Arabidopsis* na prepoznavanje PAMP molekula, a mjerenje vrijednosti pH stanične suspenzije biljaka nakon izlaganja bakterijskim ekstraktima može pokazati koliki je utjecaj induktora. Testiranje utjecaja različitih fragmenata nastalih razgradnjom proteina EF-Tu na promjenu izvanstaničnog pH pokazalo je da se epitop proteina EF-Tu kojeg biljke prepoznaju kao PAMP molekulu nalazi na N-kraju. Taj epitop je veličine 18 aminokiselina (Slika 3.) i nazvan je elf18 (Kunze i sur., 2004). Kraći i dulji fragmenti N-kraja također izazivaju stanični odgovor, no pokazalo se da je elf18 najkraći peptid koji izaziva najjači odgovor.

Danas je poznato da u cijeloj porodici *Brassicaceae* postoji specifičan PRR receptor, nazvan receptor EF-Tu (eng. *EF-Tu receptor*, EFR), koji prepoznaje sekvencu elf18 proteina EF-Tu. Prilikom prepoznavanja proteina EF-Tu kao PAMP molekule, dolazi do indukcije klasičnog obrambenog odgovora stvaranjem kaloznih naslaga i proizvodnjom R proteina, ali također i do hipersenzitivne reakcije. Zabilježeno je da ovakva indukcija obrambenog odgovora u biljkama s receptorom EFR znatno smanjuje učinkovitost transformacije bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* (Zipfel i sur., 2006).

Za razliku od porodice *Brassicaceae*, riža primjerice nema EFR receptore i sekvenca elf18 nije induktor imunološkog odgovora, no svedjedno može prepoznati protein EF-Tu iz bakterije *Acidovorax avenae* uz pomoć drugih PRR receptora i time izazvati nekoliko PTI odgovora, kao što su ekspresija gena PTI i proizvodnja  $H_2O_2$ . Nakon tretmana riže peptidima EF-Tu različite veličine ustanovljeno je da je epitop središnji dio molekule, peptid EFa50 od

oko 50 aminokiselina, a nalazi se na spoju domena I i II (Furukawa i sur., 2014). Međutim, u transgeničnoj riži, u kojoj postoji ekspresija receptora EFR, dolazi do prepoznavanja sekvence/epitopa elf18 i potpuno iste reakcije kao i u biljkama roda *Arabidopsis* (Lu i sur., 2015). Također, ekspresija receptora EFR u biljci *Nicotiana benthamiana* pokazuje isti učinak, što govori da je signalni put aktivacije PTI konzerviran među dvosupnicama i jednosupnicama (Zipfel i sur, 2006).



**Slika 3.** Struktura cijelog nemodificiranog proteina EF-Tu s označenim N-terminalnim dijelom kojeg prepoznaje receptor EFR. N-terminalni kraj prikazan je modelom kugli i štapića. Preuzeto i prilagođeno iz Kunze i sur., 2004.

### 5.2.2. Imunološki odgovor životinja na protein EF-Tu

Protein EF-Tu je kao PAMP molekula koju prepoznaje neka životinjska stanica za sada jedino opisan u bakteriji *Listeria monocytogenes* gdje ima imunostimulatorna svojstva na dendritičke stanice (eng. *dendritic cells*, DC) i stanice CD4<sup>+</sup> T u kulturi humanih stanica. Smatra se da receptor TLR4, koji se nalazi na površini stanica DC, prepoznaje protein EF-Tu te njegova aktivacija potiče sazrijevanje DC stanica, no sam mehanizam interakcije još nije poznat (Mirzaei i sur., 2016).

Ostali načini na koje životinje prepoznaju protein EF-Tu patogena uključuju mnoge druge mehanizme. Kod infekcije bakterijom *M. fermentans*, protein EF-Tu prepoznaje receptor CD21 (eng. *cluster of differentiation 21*), na kojeg se inače može vezati Epstein-Barrov virus i na taj način inficirati domaćinsku stanicu. Receptor CD21 se nalazi na površini zrelih humanih B stanica, a ustanovljeno je da nakon interakcije s proteinom EF-Tu dolazi do njegove aktivacije, čime se inducira proliferacija B limfocita. Nije još poznato koji je dio proteina EF-Tu odgovoran za specifično prepoznavanje, no interakcija se uspostavlja na 34 aminokiseline na C-kraju receptora CD21 (Balbo i sur., 2005).

Neinkapsulirani soj netipabilne bakterije *Hemophilus influenzae* (eng. *non-typeable Haemophilus influenzae*, NTHi) ispoljava protein EF-Tu na svojoj površini i mogu ga prepoznati baktericidna antitijela. Zečevi koji su cijepljeni sojem NTHi pokazali su značajno višu razinu imunoglobulina G usmjerenih na protein EF-Tu u odnosu na ostale proteine vanjske membrane bakterija. Ustanovljeno je da se epitop proteina EF-Tu kojeg prepoznaju antitijela nalazi na središnjem i C-terminalnom dijelu domene I, većini domene II i N-terminalnom dijelu domene III. Poliklonalna antitijela anti-eEF-Tu prepoznala su protein EF-Tu i nekih drugih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih neinkapsuliranih bakterija kao što su *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus* i *Moraxella catarrhalis*, što pokazuje da se i u njima protein EF-Tu ispoljava na površini stanice (Thofte i sur., 2018).

Protein EF-Tu iz bakterije *M. ovipneumoniae* inducira imunološki odgovor u miševa i uzrokuje povećanje razine imunoglobulina G i mnogih raznih citokina koji imaju ulogu u staničnoj signalizaciji kod imunološkog odgovora. Cjepivo s antiserumom na pročišćeni rekombinantni protein EF-Tu uspjelo je znatno inhibirati rast bakterije u uvjetima *in vitro*. Daljnji razvitak tog cjepiva mogao bi spriječiti širenje epidemije pneumonije ovaca koja je uzrokovana bakterijom *M. ovipneumoniae* (Jiang i sur., 2016).

### **5.3. Uloga proteina EF-Tu u bakterijskoj adheziji**

Adhezija bakterija na površine ključna je u stvaranju biofilma i uspješnosti infekcije. Proteini na površini bakterijske stanice zovu se adhezini i određeni adhezini se vežu na točno specifične ciljane molekule, primjerice receptore (Klemm i Schembri, 2000). Unatoč tome što je većina bakterijskih adhezina organizirana u fimbrije, pronađeno je tridesetak unutarstaničnih proteina koji imaju *moonlighting* uloge kao adhezini, a među njima je i protein EF-Tu. U većini slučajeva nije poznat mehanizam njihove sekrecije i pričvršćivanja na površinu. (Jeffery, 2018).

Protein EF-Tu iz bakterije *Lactobacillus johnsonii* ne posjeduje signalnu sekvencu za izlazak iz stanice, no zabilježeno je kako se lokalizira na površini bakterije i tamo veže mucine humanih epitelnih stanica debelog crijeva. Vezanje proteina EF-Tu na mucine uvelike smanjuje vezanje drugih proteina bakterije *L. johnsonii* za mucine, što povećava mogućnost infekcije. Osim za mucine, protein EF-Tu se veže i za same epitelne stanice pri pH 5,0 što su reprezentativni fiziološki uvjeti u debelom crijevu. Usporedba sekvenci izoliranog proteina EF-Tu direktno iz bakterije i površinski lokaliziranog proteina pokazala je kako je protein prisutan na površini identičan citosolnom (Granato i sur., 2004).

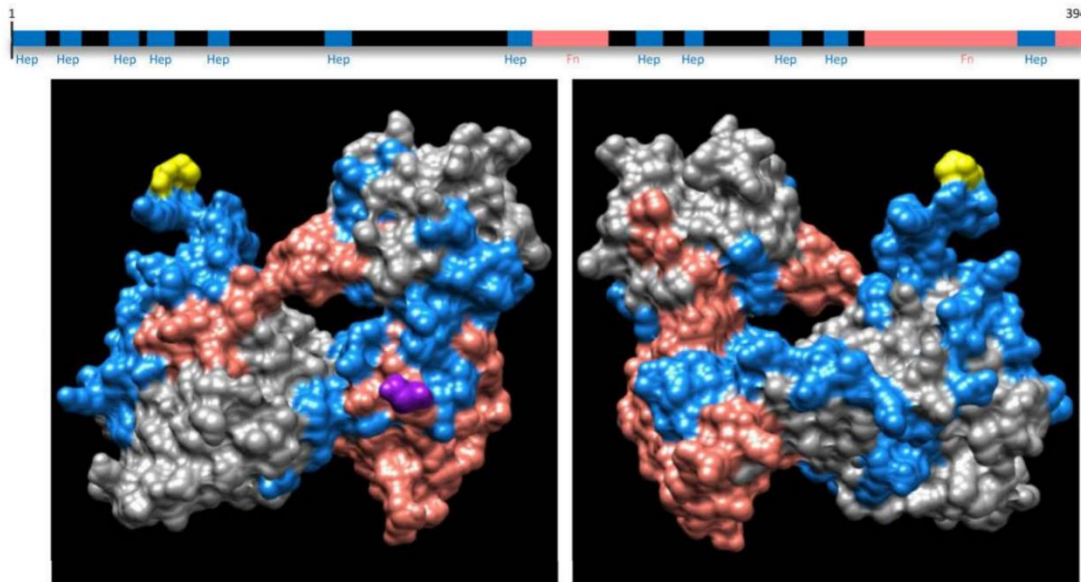
### 5.3.1. Procesiranje proteina EF-Tu na površini bakterija

Unatoč tome što svestranost *moonlighting* proteina većinom nije izazvana posttranslacijskim modifikacijama, cijepanjem na površini bakterijskih stanica protein EF-Tu može poprimiti dodatne uloge. U radu Widjaja i sur. (2017.) opisane su tri bakterije gdje je zabilježeno kako protein EF-Tu procesiranjem na staničnoj površini stječe mogućnost vezanja na razne molekule stanica domaćina: *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. Procesiranjem proteina EF-Tu na površini bakterijskih stanica najvjerojatnije se izlažu neke protein-vezujuće regije, pa tako u bakteriji *M. pneumoniae* procesirani fragmenti proteina EF-Tu sadrže neka mjesta proteinskih interakcija (eng. *protein-protein interaction*, PPI) koja inače nisu dostupna u originalnoj konformaciji cjelovitog proteina. Sve tri bakterije sadrže jedan zajednički heparin-vezujući motiv, ali i nekoliko zasebnih motiva. Bakterija *M. pneumoniae* ima čak 12 veznih mjesta za heparin u evolucijski nekonzerviranim regijama, od kojih su neka čak i bez procesiranja izložena na površini. U ovoj bakteriji pronađena su i dva fibronektin-vezujuća mjesta, koja su izložena na površini i locirana na C-kraju domene I, početku domene II i većem dijelu domene III. Predviđena lokacija i pristupačnost tih veznih mjesta može se vidjeti na Slici 4.

Određeni fragmenti, koji su rezultat cijepanja proteina EF-Tu iz bakterije *M. pneumoniae*, mogu vezati aktin, fetuin, laminin, vitronektin, laktoferin i plazminogen. Također, uočeno je da plazminogen vezan na protein EF-Tu može biti preveden u plazmin u prisutnosti aktivatora plazminogena, što je zabilježeno i u *M. hyopneumoniae*. Segmenti proteina veličine od tri do deset aminokiselina, koji se prilikom procesiranja izlože na površini proteina, zovu se kratki linearni motivi (eng. *short linear motifs*, SLiMs) i predstavljaju mjesta PPI na proteinu. Smatra se da akumulacija pozitivno nabijenih aminokiselina u motivima SLiMs ima značajnu ulogu u stvaranju interakcija PPI između proteina EF-Tu i proteina kao što su prethodno



navedeni heparin, aktin i plazminogen. Budući da sve tri bakterije, *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae* i *S. aureus*, mogu ostvarivati interakcije PPI preko proteina EF-Tu, moguće je da on ima ulogu u stvaranju i održavanju biofilma (Widjaja i sur., 2017).



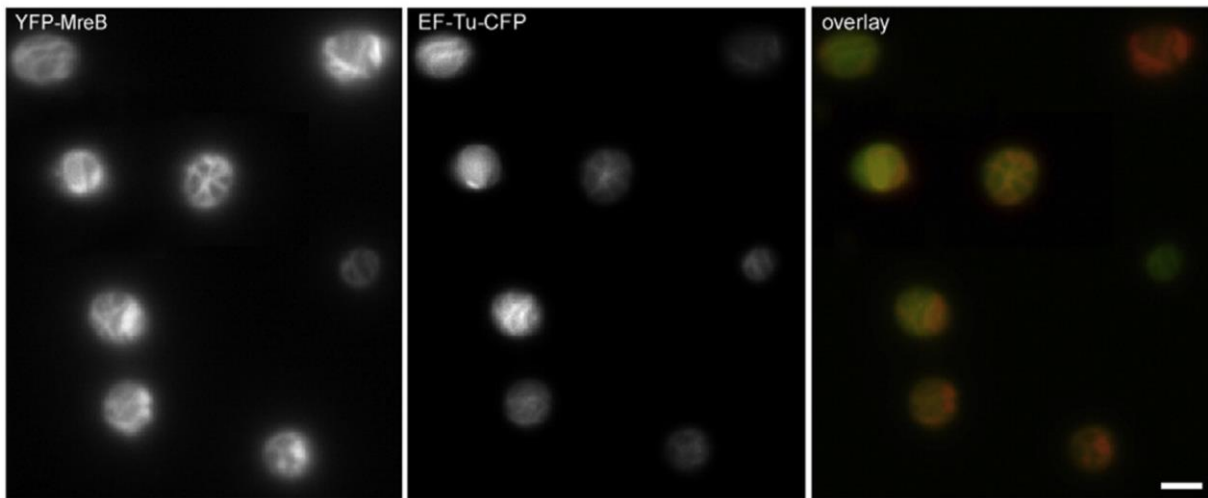
**Slika 4.** Predviđena struktura proteina EF-Tu iz bakterije *M. pneumoniae* s veznim mjestima proteina. Na gornjem dijelu slike se nalazi polipeptidni lanac EF-Tu s označenim mjestima za vezanje heparina (Hep) i fibronektina (Fn). Donji dio slike prikazuje 3D model proteina EF-Tu s označenim mjestima vezanja Hep (plavo) i Fn (ružičasto) te N-kraj (žuto) i C-kraj (ljubičasto). Preuzeto i prilagođeno iz Widjaja i sur., 2017.

#### 5.4. Oblik stanice

Postoje mnogi uvriježeni oblici bakterijskih stanica, no bakterije također mogu mijenjati svoju morfologiju ovisno o okolini ili stadiju životnog ciklusa. Nekoliko je načina na koje bakterija može promijeniti stanični oblik, a jedan od njih je pomoću proteina MreB. Protein MreB je vrlo sličan aktinu i formira filamente koji funkcioniraju kao citoskelet (Figge i sur., 2004).

U bakterijama *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*, protein EF-Tu prepoznat je kao modulator aktivnosti proteina MreB. U eksperimentima u uvjetima *in vitro* dodatak proteina EF-Tu pročišćenom proteinu MreB uzrokovao je stvaranje duljih i čvršćih filamenata proteina MreB uz povećanu brzinu polimerizacije. Međutim, eksperimentima u uvjetima *in vivo* utvrđena

je i obrnuta aktivnost. Protein MreB iz bakterije *B. subtilis* potiče stvaranje filamentoznih struktura proteina EF-Tu koje se na donjoj strani membrane kolokaliziraju s filamentima proteina MreB (Slika 5), dok u *mreB* mutanata ne dolazi do stvaranja filamenata proteina EF-Tu. Osim toga, kada je količina proteina EF-Tu djelomično smanjena, u stanici nema zastoja u translaciji bakterijskih proteina na ribosomima, no zbog smanjenja interakcija proteina EF-Tu i MreB mogu se uočiti defekti u obliku bakterijske stanice. Iz ovih činjenica se može zaključiti kako se ova dva proteina na neki način međusobno reguliraju i ovise jedan o drugom (Soufo i sur., 2015).



**Slika 5.** Utjecaj filamenata proteina MreB na protein EF-Tu u uvjetima *in vivo*. S lijeva na desno: ekspresija proteina MreB obilježenog žutim fluorescentnim proteinom (eng. *yellow fluorescent protein*, YFP), ekspresija proteina EF-Tu obilježenog cijan fluorescentnim proteinom (eng. *cyan fluorescent protein*, CFP) i preklapanje tih dviju slika koje prikazuje EF-Tu-CFP zeleno, a YFP-MreB žuto. Preuzeto i prilagođeno iz Soufo i sur., 2015.

## 6. ZAKLJUČAK

*Moonlighting* proteini su i dalje relativno novo područje istraživanja, no sve je više saznanja o njihovim raznolikim ulogama u svim domenama života, pa čak i virusima. Zbog jednostavnosti istraživanja, bakterije za sada imaju najviše otkrivenih *moonlighting* proteina, a u eukariotima je najviše istraživanja napravljeno u kvascu, poznatom modelnom organizmu. Upravo zbog toga što je mnogo *moonlighting* proteina uključeno u esencijalne stanične procese, relativno ih je teško ciljano istraživati u drugim organizmima u uvjetima *in vivo*, ali vrlo je vjerojatno da ih ima više nego što je poznato. Istraživanja o nekanoničkim funkcijama humanih proteina od velike su važnosti i to bi moglo pridonijeti razumijevanju složenosti ljudskog genoma. Osim toga, mnogi humani *moonlighting* proteini imaju neku funkciju u razvoju i opstanku karcinoma, te njihova identifikacija može pomoći pri otkrivanju mehanizama nastanka raka, ali i nekih genetičkih bolesti. Njihovi putevi razvoja i sami proteini koji u njima sudjeluju time mogu biti cilj novih lijekova za do sada neizlječive bolesti.

Bakterijski *moonlighting* proteini također su često faktori u nastanku bolesti ljudi, životinja i biljaka. Stvaranje biofilmova i interakcija sa stanicom domaćina neki su od načina da bakterija napadne organizam i *moonlighting* proteini su nerijetko uključeni u te procese. Elongacijski faktor Tu samo je jedan od bakterijskih *housekeeping* proteina koji ima *moonlighting* uloge i u većini slučajeva naći će se izvan stanice kako bi obavljao neku nekanoničku funkciju. Otkrića da protein EF-Tu s bakterijske površine može interagirati sa stanicama imunološkog sustava daju mogućnost da se razviju i cjepiva na temelju rekombinantnih EF-Tu proteina. Razumijevanje uloge *moonlighting* proteina u patogenosti bakterija ključno je u doba sve češće otpornosti bakterija na antibiotike.

Evolucija *moonlighting* proteina u bakterijama može biti posljedica težnje genoma da bude što kompaktniji, no nije sasvim sigurno zašto oni postoje posebice u velikim genomima eukariota. Unatoč tome što ih nije jednostavno istraživati, daljnje proučavanje *moonlighting* proteina bi nam moglo dati novi uvid u funkcioniranje signalnih puteva i samih proteina, te evoluciju genoma.

## 7. LITERATURA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*, 8th edition, Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York, NY: Garland Science.
- Atkinson, M. M., Huang, J. S., & Knopp, J. A. (1985). The hypersensitive reaction of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*: Activation of a plasmalemma K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange mechanism. *Plant Physiology*, 79(3), 843-847.
- Balbo, M., Barel, M., Lottin-Divoux, S., Jean, D., & Frade, R. (2005). Infection of human B lymphoma cells by *Mycoplasma fermentans* induces interaction of its elongation factor with the intracytoplasmic domain of Epstein-Barr virus receptor (gp140, EBV/C3dR, CR2, CD21). *FEMS Microbiology Letters*, 249(2), 359–366.
- Banerjee, N., & Mukhopadhyay, S. (2016). Viral glycoproteins: Biological role and application in diagnosis. *Virusdisease*, 27(1), 1–11.
- Campbell, R., & Scanes, C. (1995). Endocrine peptides' moonlighting' as immune modulators: Roles for somatostatin and GH-releasing factor. *Journal of Endocrinology*, 147(3), 383–396.
- Cook, J. D., & Lee, J. E. (2013). The secret life of viral entry glycoproteins: Moonlighting in immune evasion. *PLoS Pathogens*, 9(5).
- Dallo, S. F., Kannan, T. R., Blaylock, M. W., & Baseman, J. B. (2002). Elongation factor Tu and E1  $\beta$  subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 46(4), 1041–1051.
- Ezzat, A., Szabó, Z., & Nyéki, J. (2014). Induce the plant resistance to pathogen infection. *International Journal of Horticultural Science*, 20(1–2), 89–93.
- Figge, R. M., Divakaruni, A. V., & Gober, J. W. (2004). MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1321–1332.
- Filer, D., & Furano, A. V. (1980). Portions of the gene encoding elongation factor Tu are highly conserved in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 728–734.
- Furukawa, T., Inagaki, H., Takai, R., Hirai, H., & Che, F.-S. (2014). Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(2), 113–124.

- Gancedo, C., & Flores, C.-L. (2008). Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(1), 197–210.
- Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2004). Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity*, 72(4), 2160–2169.
- Green, E. R., & Mecsas, J. (2016). Bacterial secretion systems: an overview. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 213-239.
- Gupta, M. N., Kapoor, M., Majumder, A. B., & Singh, V. (2011). Isozymes, moonlighting proteins and promiscuous enzymes. *Current Science*, 1152–1162.
- Hall, J. E. (2017). *Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology*, Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Harvey, K. L., Jarocki, V. M., Charles, I. G., & Djordjevic, S. P. (2019). The diverse functional roles of elongation factor Tu (EF-Tu) in microbial pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2351.
- Henderson, B., Fares, M. A., & Martin, A. C. R. (2016). *Protein Moonlighting in Biology and Medicine*. Wiley.
- Henderson, B., & Martin, A. (2011). Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. In *Between pathogenicity and commensalism* (pp. 155–213). Springer.
- Jeffery, C. (2018). Intracellular proteins moonlighting as bacterial adhesion factors. *AIMS Microbiology*, 4(2), 362.
- Jeffery, C. J. (2017). Protein moonlighting: What is it, and why is it important? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373:20160523.
- Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8–11.
- Jia, B., Cheong, G.-W., & Zhang, S. (2013). Multifunctional enzymes in archaea: Promiscuity and moonlight. *Extremophiles*, 17(2), 193–203.
- Jiang, F., He, J., Navarro-Alvarez, N., Xu, J., Li, X., Li, P., & Wu, W. (2016). Elongation factor Tu and heat shock protein 70 are membrane-associated proteins from *Mycoplasma ovipneumoniae* capable of inducing strong immune response in mice. *PloS One*, 11(8).
- Johansen, J. S., Kavaliauskas, D., Pfeil, S. H., Blaise, M., Cooperman, B. S., Goldman, Y. E., Thirup, S. S., & Knudsen, C. R. (2018). *E. coli* elongation factor Tu bound to a GTP analogue displays an open conformation equivalent to the GDP-bound form. *Nucleic Acids Research*, 46(16), 8641–8650.

- Klemm, P., & Schembri, M. A. (2000). Bacterial adhesins: Function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(1), 27–35.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3496–3507.
- Lathe, W. C., & Bork, P. (2001). Evolution of tuf genes: Ancient duplication, differential loss and gene conversion. *FEBS Letters*, 502(3), 113–116.
- Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2012). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Sixth edition. New York: W. H. Freeman
- Lu, F., Wang, H., Wang, S., Jiang, W., Shan, C., Li, B., Yang, J., Zhang, S., & Sun, W. (2015). Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(7), 641–652.
- Mirzaei, R., Saei, A., Torkashvand, F., Azarian, B., Jalili, A., Noorbakhsh, F., Vaziri, B., & Hadjati, J. (2016). Identification of proteins derived from *Listeria monocytogenes* inducing human dendritic cell maturation. *Tumor Biology*, 37(8), 10893–10907.
- N'Diaye, A. R., Borrel, V., Racine, P.-J., Clamens, T., Depayras, S., Maillot, O., Schaack, B., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., & Feuilloley, M. G. (2019). Mechanism of action of the moonlighting protein EfTu as a substance P sensor in *Bacillus cereus*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14.
- Negrutskii, B., & El'Skaya, A. (1998). Eukaryotic translation elongation factor 1 $\alpha$ : Structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 60, pp. 47–78). Elsevier.
- Pancholi, V., & Fischetti, V. A. (1992a). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(2), 415–426.
- Philpott, C. C., Klausner, R. D., & Rouault, T. A. (1994). The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: The role of active-site residues in ligand binding and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7321–7325.
- Piatigorsky, J. (1992). Lens crystallins. Innovation associated with changes in gene regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(7), 4277–4280.
- Piatigorsky, Joram, & Wistow, G. J. (1989). Enzyme/crystallins: Gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*, 57(2), 197–199.

- Šanderová, H., Hůlková, M., Maloň, P., Kepková, M., & Jonák, J. (2004). Thermostability of multidomain proteins: Elongation factors EF-Tu from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus* and their chimeric forms. *Protein Science*, *13*(1), 89–99.
- Schulz, L. C., & Bahr, J. M. (2004). Potential endocrine function of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase during implantation. *General and Comparative Endocrinology*, *137*(3), 283–287.
- Soufo, H. J. D., Reimold, C., Breddermann, H., Mannherz, H. G., & Graumann, P. L. (2015). Translation elongation factor EF-Tu modulates filament formation of actin-like MreB protein in vitro. *Journal of Molecular Biology*, *427*(8), 1715–1727.
- Thofte, O., Su, Y.-C., Brant, M., Littorin, N., Duell, B. L., Alvarado, V., Jalalvand, F., & Riesbeck, K. (2018). EF-Tu from non-typeable *Haemophilus influenzae* is an immunogenic surface-exposed protein targeted by bactericidal antibodies. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2910.
- Trent, J. D., Kagawa, H. K., Yaoi, T., Olle, E., & Zaluzec, N. J. (1997). Chaperonin filaments: The archaeal cytoskeleton? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(10), 5383–5388.
- Widjaja, M., Harvey, K. L., Hagemann, L., Berry, I. J., Jarocki, V. M., Raymond, B. B. A., Tacchi, J. L., Gründel, A., Steele, J. R., & Padula, M. P. (2017). Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–17.
- Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T., & Chiao, J. (1996). The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood*, *87*(11), 4502–4506.
- Yanagawa, T., Funasaka, T., Tsutsumi, S., Raz, T., Tanaka, N., & Raz, A. (2005). Differential regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor activities by protein kinase CK2 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(11), 10419–10426.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, *125*(4), 749–760.

## 8. SAŽETAK

*Moonlighting* proteini su skupina proteina koji osim svoje kanoničke, mogu izvršavati i druge, nepovezane funkcije. *Moonlighting* aktivnost nije rezultat alternativnog prekrivanja molekule RNA, posttranslacijskih modifikacija ili fuzija gena. Broj otkrivenih *moonlighting* proteina ubrzano raste i pronađeni su u eukariotima, bakterijama, arhejama, pa čak i nekim virusima. Najviše je poznatih bakterijskih *moonlighting* proteina, te su oni najdetaljnije istraženi. Čest slučaj kod bakterijskih *moonlighting* proteina je da se originalno citosolni proteini ispoljavaju na staničnu površinu, gdje sudjeluju u procesima koji pridonose patogenosti bakterija. Jedan od takvih proteina je elongacijski faktor Tu (EF-Tu), čije su pojedine *moonlighting* uloge opisane u ovom radu. Kanonička uloga proteina EF-Tu je donošenje aa-tRNA na ribosom prilikom elongacijske faze sinteze proteina. Kod određenih bakterija protein EF-Tu može se naći na staničnoj površini i tamo sudjelovati u bakterijskoj adheziji, dok izlaganje proteinu EF-Tu iz nekih drugih bakterija izaziva imunološki odgovor u biljkama ili životinjama. Budući da su ovakve *moonlighting* uloge proteina EF-Tu uključene u bakterijsku infekciju, postoji mogućnost da se razviju određena cjepiva na temelju rekombinantnih EF-Tu proteina. Osim uloge u patogenosti, protein EF-Tu nekih bakterija također može pomoći u održavanju oblika stanice preko interakcija s proteinima citoskeleta. Buduća istraživanja *moonlighting* proteina sigurno će pridonijeti razumijevanju načina funkcioniranja genoma i signalnih puteva, te razvijanju novih lijekova i cjepiva.



## 9. SUMMARY

Moonlighting proteins are a group of proteins that, in addition to their canonical role, perform other, unrelated functions. Moonlighting activity is not caused by RNA splice variants, post-translational modifications or gene fusion. The number of detected moonlighting proteins is increasing rapidly and they can be found in eukaryotes, bacteria, archaea and even some viruses. Bacterial moonlighting proteins are the most abundant and they are extensively studied. It is common for originally cytosolic bacterial proteins to be exported to the cell surface in order to perform moonlighting activities. Once they are on the surface of the cell, they can participate in processes that contribute to the pathogenicity of bacteria. One such protein is the elongation factor Tu (EF-Tu) whose individual moonlighting roles are described in this paper. The canonical role of the EF-Tu protein is to catalyze the binding of aa-tRNA to the ribosome during the elongation phase of protein synthesis. In certain bacteria the EF-Tu protein can be found on the cell surface where it participates in bacterial adhesion, while exposure to the EF-Tu protein of some other bacteria can trigger the immune response in plants and animals. Since these kinds of moonlighting activities of EF-Tu protein are involved in bacterial infection, certain vaccines may be developed based on a recombinant EF-Tu protein. In addition to the role in pathogenicity, EF-Tu protein of some bacteria can also help maintain the shape of the cells through interactions with cytoskeletal proteins. Future research into moonlighting proteins will certainly contribute to understanding how genome and cell pathways function, but also help to develop new drugs and vaccines.