

Autoreferat

związany z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego

dr Agata L Starosta

Rola czynnika elongacyjnego EF-P w biosyntezie białka.

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin, 20.10.2018

Autoreferat

Autoreferat

1. Imiona i nazwisko	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazw, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 65, poz. 595 ze zm.)	4
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
4.3 Omówienie osiągnięcia naukowego – celów szczególnych i osiągniętych wyników	5
Podsumowanie	26
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	27
5.1 Udział w projektach naukowych / granty naukowe	27
5.2 Wkład w naukę po doktoracie	27
6. Bibliografia	30

Autoreferat

1. Imiona i nazwisko

Agata Lucyna Starosta

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazw, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Doktor – 2012, Uniwersytet Ludwik’a-Maximillian’a w Monachium, Niemcy, Gene Center i Wydział Chemii, ‘Antibiotics and translation. Overcoming emerging bacterial resistance to old and new antimicrobials.’

Magister – 2007, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, specjalizacja biochemia na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od 03/2018 – adiunkt, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie – kierownik Laboratorium Ekspresji Genów w ECOTECH-COMPLEX

02/2015 – 02/2012 podoktorski staż naukowy / Stypendium Marii Skłodowskiej - Curie - Horyzont 2020, Newcastle University, Centre for Bacterial Cell Biology, Wielka Brytania

02/2012 – 12/2014 podoktorski staż naukowy / Stypendium AXA Research Fund, Uniwersytet Ludwik’a-Maximillian’a w Monachium, Niemcy, Gene Center i Wydział Chemii

10/2007 – 01/2012 studia doktoranckie / Laboratorium doktora Daniela Wilsona, Uniwersytet Ludwik’a-Maximillian’a w Monachium, Niemcy, Gene Center i Wydział Chemii

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 65, poz. 595 ze zm.)

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Rola czynnika elongacyjnego EF-P w biosyntezie białka.

4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Publikacja 1: Ude, S., Lassak, J., **Starosta, A. L.**, Kraxenberger, T., Wilson, D. N., and Jung, K. (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches.

Science 339, 82-85. (IF₂₀₁₃ = 31,477, punkty MNiSW₂₀₁₃ = 50, cytowane 172 razy)

Mój udział polegał na planowaniu eksperymentów i protokołów. Przygotowałam system do ko-ekspresji czynnika EF-P z białkami przeprowadzającymi jego modyfikację. Prowadziłam nadekspresję oraz oczyszczanie czynnika EF-P (modyfikowanego, niemodyfikowanego oraz mutanty), które następnie wykorzystałam do testów na aktywność in vitro. Przygotowaniu konstruktów dla różnych wariantów białek posiadających motyw poliprolinowy (Pro-Pro-Pro). Konstrukty te były wykorzystane do in vitro analizy pauzowania rybosomu oraz do testowania aktywności czynnika EF-P. Wyniki te zostały zaprezentowane na Rycinie 1F, 2C, 2D oraz 3F. Interpretowałam wyniki. Współuczestniczyłam w przygotowaniu tekstu manuskryptu (sekcja materiały i metody) oraz samodzielnie przygotowałam panel 1F, 2C, 2D oraz 3F.

Swój udział w w/w publikacji oceniam na 25%.

Autoreferat

Publikacja 2: Peil, L., Starosta, A. L., Lassak, J., Atkinson, G. C., Virumae, K., Spitzer, M., Tenson, T., Jung, K., Remme, J., and Wilson, D. N. (2013) Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P. *PNAS* 110, 15265-15270. (IF₂₀₁₃ = 9,809, MNiSW₂₀₁₃ = 45, cytowane 66 razy)

Mój udział polegał na planowaniu eksperymentów, ekspresji i oczyszczeniu modyfikowanego czynnika EF-P, przygotowaniu konstruktów dla różnych wariantów motywu poliprolinowego (X-Pro-Pro-X) oraz przeprowadzeniu eksperymentów in vitro z wykorzystaniem tych konstruktów w celu określenia siły pauzowania rybosomu przy braku lub w obecności aktywnego EF-P. Wyniki te zostały zaprezentowane na Rycinie 4A-B. Interpretowałam wyniki, współuczestniczyłam w przygotowaniu tekstu manuskryptu (materiały i metody) oraz samodzielnie przygotowałam Ryciny 1-4 i 5B, D.

Swój udział w w/w publikacji oceniam na 25%.

Publikacja 3: Starosta, A. L., Lassak, J., Peil, L., Atkinson, G., Virumae, K., Tenson, T., Remme, J., Jung, K., and Wilson, D. N. (2014) Translational stalling at polyproline-stretches is modulated by the sequence context upstream of the stall site.

Nucleic Acids Research 42(16):10711-9. (IF₂₀₁₄ = 9,112, MNiSW₂₀₁₄ = 40, cytowane 38 razy)

Mój udział polegał na zaproponowaniu hipotezy badawczej. Przygotowaniu konstruktów, które wykorzystałam do eksperymentów obejmujących analizy in vitro translacji (in vitro coupled transcription-translation assay) oraz analiz toe-printing. Wyniki te zostały zaprezentowane na Rycinie 1C, 2 oraz 3. Interpretowałam wyniki. Przygotowałam tekst manuskryptu oraz Ryciny 1-4 i S1.

Swój udział w w/w publikacji oceniam na 60%.

Publikacja 4 : Starosta, A. L., Lassak, J., Peil, L., Atkinson, G. C., Woolstenhulme, C. J., Virumae, K., Buskirk, A., Tenson, T., Remme, J., Jung, K., and Wilson, D. N. (2014) A conserved proline triplet in Val-tRNA synthetase and the origin of elongation factor P.

Cell Reports Oct 23;9(2):476-83. (IF₂₀₁₄ = 7,407, MNiSW₂₀₁₄ = 35, cytowane 10 razy)

Mój udział polegał na planowaniu eksperymentów i protokołów, przygotowaniu konstruktów dla różnych wariantów enzymu – Syntetazy walino-tRNA, które wykorzystałam do nadekspresji i oczyszczania białka rekombinowanego. Oczyszczony dziki typ białka, oraz mutanty (GPP, PGP, PPG, GGG, T222P, GPP/T222P, PGP/T222P) testowałam in vitro w celu ustalenia ich aktywności oraz specyficzności względem różnych aminokwasów. Wyniki te zostały zaprezentowane na Rycinie 1F, 1G, 2 oraz 3. Interpretowałam wyniki. Współuczestniczyłam w przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz samodzielnie przygotowałam Ryciny 1-4 i abstrakt graficzny.

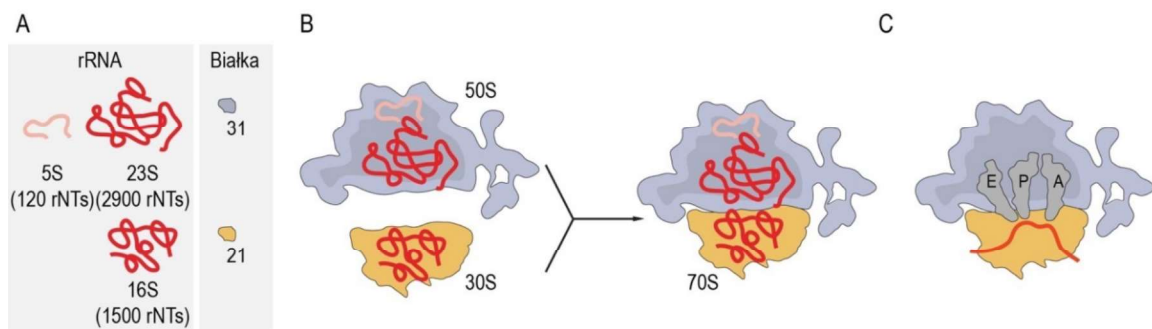
Swój udział w w/w publikacji oceniam na 60%.

4.3 Omówienie osiągnięcia naukowego – celów szczególnych i osiągniętych wyników

Biosynteza białka (translacja) jest podstawowym procesem w każdej żywej komórce. Centralnym komponentem tego procesu jest rybosom – makromolekuła, nazywana również nanomaszyną – której zadaniem jest tłumaczenie informacji zakodowanej w matrycowym RNA (mRNA) na sekwencję aminokwasową polipeptydu. Rybosom bakteryjny zbudowany jest z dwóch podjednostek rybosomalnych – małej podjednostki (30S) składającej się z 16S rRNA oraz, w przypadku bakterii, z około 21 białek rybosomalnych oraz z dużej podjednostki (50S) składającej się z 5S rRNA, 23S rRNA oraz z

Autoreferat

około 31-33 białek rybosomalnych (*Rysunek 1A-B*). Obie podjednostki tworzą funkcjonalną całość (70S)¹. Funkcją podjednostki 30S jest dekodowanie informacji zawartej w mRNA, natomiast podjednostka 50S posiada aktywność transferazową i bierze udział w katalizie wiązania peptydowego między aminokwasami w rosnącym łańcuchu polipeptydowym. W strukturze rybosomu możemy wyróżnić trzy miejsca wiązania tRNA – miejsca A, P i E (*Rysunek 1C*). Nowo dostarczane aminoacylowane-tRNA niosące aminokwas jest przyłączane do miejsca A rybosomu, peptydylowe-tRNA wiąże się w miejscu P, zaś deacetylowane tRNA – pozbawione aminokwasu, który uległ przyłączeniu do łańcucha polipeptydowego – opuszczają rybosom przez miejsce E (tzw. Exit).



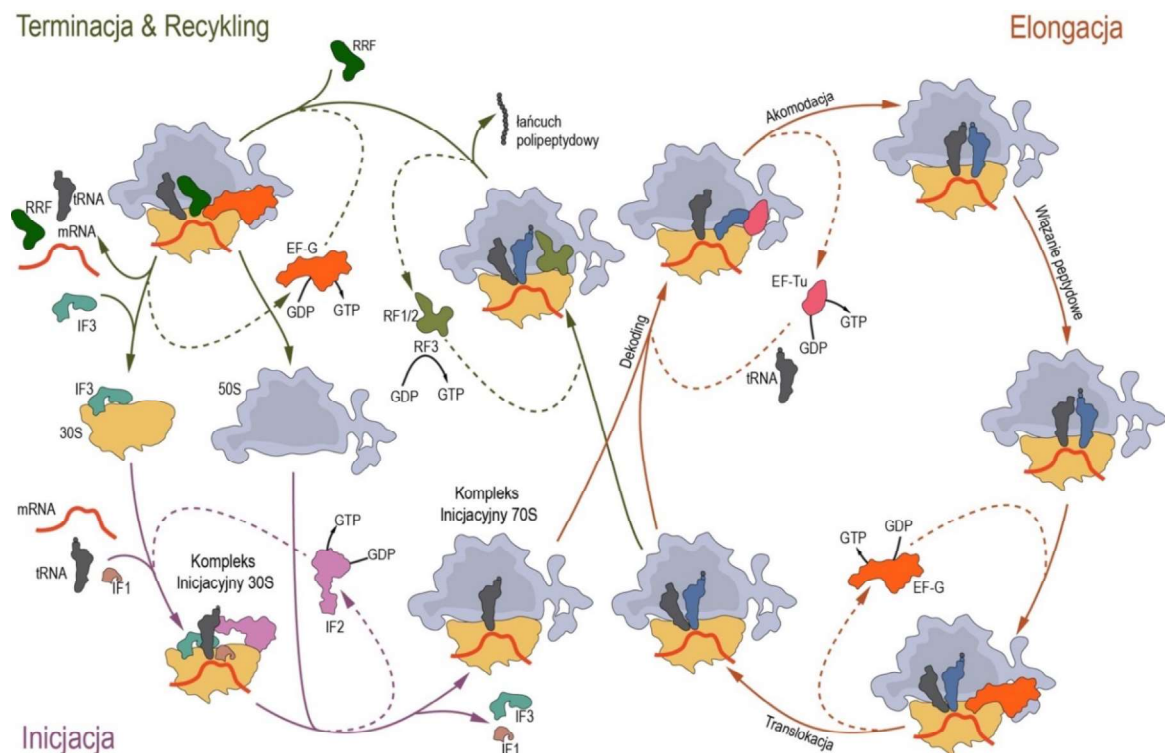
Rysunek 1. (A) Rybosom jest zbudowany z trzech cząsteczek rybosomalnego RNA oraz z około 50 białek. (B) Dwie podjednostki rybosomalne: mała 30S i duża 50S tworzą rybosom 70S. (C) Wyróżnia się 3 miejsca wiązania transferowego RNA: A, P i E.

Synteza białka jest procesem cyklicznym, który może być podzielony na cztery fazy. W każdym z tych kroków zaangażowane są wspomagające czynniki translacyjne, a aktywności GTPaz, tzw. translacyjne GTPazy¹. Synteza białka rozpoczyna się poprzez utworzenie tak zwanego „kompleksu inicjacyjnego 30S” (*Rysunek 2*). Czynniki inicjatorowy 3 (IF3) wiąże się do małej podjednostki rybosomu aby zapobiec przedwczesnemu związaniu się małej podjednostki z dużą 50S². W następnym etapie do kompleksu dołączają się mRNA, czynniki inicjatorowe 1 (IF1) i 2 (IF2) oraz inicjatorowy fMet-tRNA. W końcowym etapie inicjacji translacji, przyłącza się duża podjednostka rybosomowa, w rezultacie czego, czynniki inicjatorowe opuszczają rybosom, który teraz jest gotowy do zasadniczego etapu, tj. elongacji.

Na etapie elongacji, aminoacylowane tRNA (aa-tRNA) jest dostarczane do rybosomu w kompleksie z czynnikiem EF-Tu i w obecności GTP (*Rysunek 2*)¹. Następuje proces dekodowania – czyli rozpoznanie kodonu na mRNA w pozycji A rybosomu z aa-tRNA¹ w celu utworzenia komplementarnego dupleksu, będącego warunkiem poprawnego tłumaczenia informacji z mRNA na sekwencję polipeptydową – który kończy się hydrolizą GTP do GDP oraz opuszczeniem rybosomu przez EF-Tu. Prawidłowo rozpoznane tRNA przyjmuje właściwą strukturę w miejscu A rybosomu, i jego fragment aminoacylowy znajduje się w bliskiej odległości do miejsca P, w której ulokowany jest inicjatorowy fMet-tRNA (dla pierwszego wiązania) lub polipeptydowe-tRNA rosnącego łańcucha aminokwasowego. Następuje spontaniczne utworzenie wiązania peptydowego w centrum peptydylowym rybosomu (PTC), a następnie ma miejsce translokacja, czyli przesunięcie tRNA oraz mRNA o jeden kodon, proces zachodzący przy udziale translacyjnej GTPazy czynnika elongacyjnego EF-G. Po translokacji miejsce A jest puste i rybosom jest gotowy do nowej rundy dekodowania, w cyklu elongacyjnym. Obecność kodonu stop w centrum

Autoreferat

dekodującym jest sygnałem do następnego kroku w biosyntezie białka, tj. terminacji procesu translacji. Kodon stop jest rozpoznawany przez białkowy czynnik uwalniający RF1 – rozpoznający kodony UAA/UAG czy RF2 – rozpoznający kodony UAA/UGA³, który wiąże się w miejsce A rybosomu i pośredniczy w hydrolizie nowo utworzonego łańcucha polipeptydowego z tRNA (Rysunek 2)⁴. Następnie, czynnik GTPazowy RF3 pomaga destabilizować wiązanie RF1/2 na rybosomie, przez co promuje jego dysocjację z rybosomu⁵⁻⁷. „Pusty” rybosom ulega rozdzysocjowaniu na podjednostki z pomocą rybosomalnego czynnika uwalniającego RRF (ang. *ribosome release factor*) oraz GTPazy EF-G, czego konsekwencją jest uwolnienie podjednostek, które mogą rozpocząć nowy cykl biosyntezy białka (Rysunek 2).



Rysunek 2. Proces biosyntezy białka jest procesem cyklicznym, składającym się z etapów Inicjacji, Elongacji, Terminacji i Recyklingu. Zmodyfikowane źródło⁸.

Proces biosyntezy białka jest jednym z najczęstszych elementów metabolicznych komórki bakteryjnej na który działają antybiotyki. W grupie stosowanych obecnie antybiotyków wyróżnia się wiele grup inhibitorów wzrostu bakterii, które zaburzają proces translacji na wielu jego etapach. Antybiotyki, w zależności od miejsca wiązania się do rybosomu, możemy podzielić je na: (I) blokujące funkcje małej podjednostki – blokujące proces dekodowania, przykładowo: tetracykliny, aminoglikozydy (kanamycyna, neomycyna), oraz (II) wiążące się do dużej podjednostki – blokujące funkcję centrum peptydylo-transferazowego, na przykład: chloramfenikol, linezolid, hygromycyna A, - blokujące tunel wyjścia łańcuch polipeptydowego, na przykład makrolidy (erytromycyna, azytromycyna), linkozamidy (klindomycyna) lub działające na centrum GTPazowe (tiopeptydy – tiostrepton)⁸⁻¹⁰.

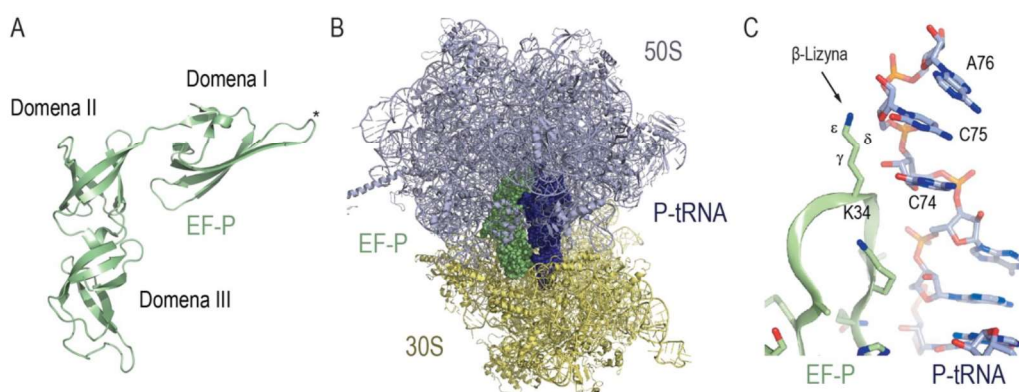
Autoreferat

Czynnik elongacyjny EF-P

Obok klasycznych czynników zaangażowanych w translację: czynniki inicjatorowe, elongacyjne i terminujące biosyntezę białka, wyróżniamy szereg czynników wspomagających aparat translacyjny, zwłaszcza w warunkach stresowych. I tak, czynnik RelA wiąże się do rybosomu i generuje alarmon ppGpp w czasie niedoboru substancji odżywczych, czynniki takie jak RelE, pY, RMF, HPF i EttA wiążą się do rybosomu w niekorzystnych warunkach dla wzrostu komórki by wyłączyć funkcje rybosomu, funkcja czynników LepA i BipA jest wiązana z re-programowaniem translacji, czynniki TetM i FusB pomagają niwelować skutki obecności antybiotyków (omówione szczegółowo przez¹¹). Do grona wyspecjalizowanych czynników translacyjnych należy również czynnik elongacyjny EF-P.

Czynnik elongacyjny EF-P został odkryty w latach 70-tych, jako rozpuszczalne białko, które wiąże się do rybosomu i stymuluje tworzenie wiązania peptydowego – mierzonego jako transfer fMet na antybiotyk puromycynę¹². Następnie pokazano, że czynnik EF-P stymuluje również transfer fMet na pochodne aminokwasów skoniugowane z cytydyną i adenozyzną (CA), tak zwane analogi końca 3' aa-tRNA¹³. Właściwości stymulowania formowania wiązania peptydowego były odwrotnie proporcjonalne do rozmiaru łańcucha bocznego testowanego aminokwasu – transfer fMet na mały aminokwas, taki jak glicyna, był ściśle zależny od obecności EF-P, podczas gdy transfer na większe, hydrofobowe aminokwasy, takie jak fenyloalanina, był niezależny od obecności czynnika EF-P^{13,14}. Pokazano również, że czynnik EF-P wpływa stymulująco na translację *in vitro* natywnych mRNA^{14,15}. Czynnik EF-P występuje w komórkach bakteryjnych w stosunku jedna kopia EF-P na dziesięć kopii rybosomu¹⁶, i wykazano że może on asocjować z monosomami 70S, jak i z polisomami¹⁷. Struktura 3D czynnika EF-P ujawniła trzydomenową architekturę tego białka przypominającą klasyczny kształt litery L, charakterystyczny dla tRNA^{18–21}, z domeną I naśladującą ramię akceptorowe tRNA (Rysunek 3A). EF-P związane do rybosomu łączy obie podjednostki i lokuje się w pozycji między miejscem P- i E-rybosomu, natomiast domena I sięga ku końcowi CCA^{22,23} (Rysunek 3B). Analizy filogenetyczne pokazują, że czynnik EF-P jest konserwatywnym białkiem w obrębie bakterii²⁴. Najbardziej konserwatywnym fragmentem czynnika EF-P jest pętla w domenie I niosąca sekwencję konsensusową KPGKG^{19,24} (Rysunek 3C)^{20,25,26}.

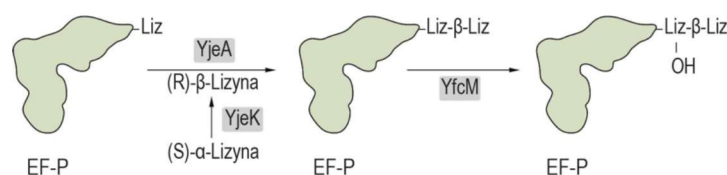
Autoreferat



Rysunek 3. (A) Czynn timer elongacyjny EF-P jest białkiem trójdomenowym o charakterystycznym dla tRNA kształcie litery L. (B) EF-P wiąże się do rybosomu pomiędzy miejscem P i E rybosomu. (C) Lizyna K34 czynn timer elongacyjnego EF-P ulega modyfikacji. Zmodyfikowane źródło²⁷.

Modyfikacja post-translacyjna czynn timer EF-P

Analizy endogennego EF-P z *Escherichia coli* przy użyciu spektrometru mas ujawniły obecność dodatkowych 144 Da sugerując, że lizyna 34 u *E. coli* jest miejscem post-translacyjnej modyfikacji¹⁷. U *E. coli*, został zidentyfikowany szlak modyfikacji EF-P, w którym wyróżniono trzy enzymy: YjeK (EmpB), YjeA (EmpA) oraz YfcM (EmpC) (Rysunek 4)^{20,24–26}. YjeK jest 2,3-aminomutazą lizyny i konwertuje (S)- α -lizynę na (R)- β -lizynę^{26,28}. Następnie, YjeA pośredniczy w transferze (R)- β -lizyny na lizynę K34 czynn timer EF-P. Co ciekawe, YjeA jest homologiem syntetazy lizylo-tRNA, ale nie posiada N-terminalnej domeny rozpoznającej kodon²⁴. Niemniej jednak, YjeA wykazuje analogiczną aktywność do syntetazy tRNA, a mianowicie aktywuje lizynę (preferencyjnie (R)- β -lizynę) cząsteczką ATP, ale zamiast transferu na tRNA²⁰ przenosi grupę lizynową na grupę ϵ -amino lizyny K34 czynn timer EF-P^{20,26}. W konsekwencji, lizyna K34 zostaje modyfikowana, co skutkuje wzrostem masy czynn timer EF-P o 128 Daltonów^{20,25,26}. Ten model jest w zgodzie z eksperymentami pokazującymi, że YjeK wzmacnia aktywność YjeA *in vivo*^{20,29}. *In vitro* (R)- β -lizyna jest 100-krotnie lepszym substratem dla YjeA niż α -lizyna³⁰. Ostatni krok szlaku modyfikacji EF-P u *E. coli* jest prowadzony przez YfcM, który hydroksyluje węgiel-5 (C5) lizynyłowanej lizyny K34, co skutkuje wzrostem masy modyfikacji o 16 Da. Masa ostatecznej modyfikacji czynn timer EF-P wynosi 144 Da²⁶, co jest zgodne z analizami endogennego białka^{17,26}. Podsumowując, można stwierdzić, że endogenne EF-P posiada unikalną modyfikację ϵ (R)- β -lizylo-hydroksylizyną (ang. ϵ (R)- β -lysyl-hydroxylysine). Podczas gdy większość bakterii posiada silnie konserwatywną lizynę na pozycji analogicznej do K34 czynn timer EF-P u *E. coli*, analizy genetyczne pokazują brak genów dla YjeA oraz YjeK u wielu grup bakterii²⁴, co sugeruje brak lizynyłacji EF-P u tych organizmów. Co więcej, występuje populacja bakterii takich jak *Thermus thermophilus* czy *Pseudomonas aeruginosa*, które w miejscu lizyny posiadają argininę.

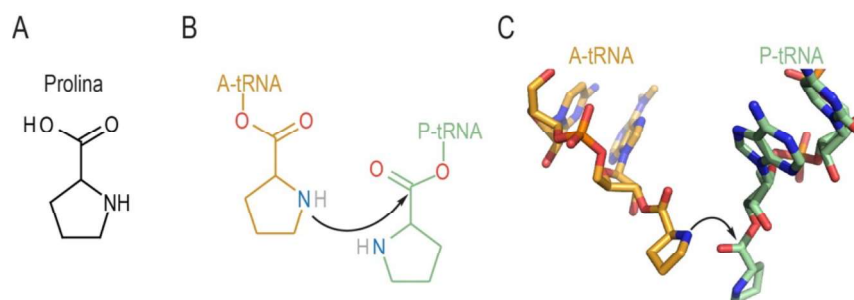


Rysunek 4. Lizyna 34 czynn timer elongacyjnego EF-P z bakterii *Escherichia coli* jest modyfikowany ϵ (R)- β -lizylo-hydroksylizyną. Zmodyfikowane źródło²⁷.

Autoreferat

Wiązanie peptydowe

Tworzenie wiązania peptydowego ma miejsce w centrum peptydylowo-transferazowym dużej podjednostki. Jest to reakcja między peptydyl-tRNA w miejscu P-rybosomu oraz nowo dostarczoną aa-tRNA w miejscu A-rybosomu. Następuje atak nukleofilowy α -amino-grupy aa-tRNA na grupę karbonylową peptydyl-tRNA. W konsekwencji prowadzi to do wydłużenia o jeden aminokwas peptydylowego-tRNA w miejscu A-rybosomu oraz deacetylacji tRNA w miejscu P^{31,32}. Nie wszystkie aminokwasy są włączane do rosnącego łańcucha polipeptydowego z tą samą szybkością. Szczególnym odstępstwem jest prolina (Pro), która jest unikalna spośród dwudziestu aminokwasów poprzez posiadanie pierścienia pyrrolidynowego, łączącego węgiel α (C α) z azotem grupy aminowej. Będąc imino- a nie aminokwasem (*Rysunek 5A*), prolina jest słabym akceptorem grupy peptydylowej będąc w miejscu A-rybosomu (*Rysunek 5B,C*). Jak wykazano, katalizowany w procesie formowania wiązania peptydowego przez rybosom transfer grupy peptydylowej do Pro-tRNA^{Pro} jest najwolniejszy ze wszystkich aminokwasów^{33,34}. Co więcej, Pro jest również słabym donorem aminokwasu gdy znajduje się w miejscu P-rybosomu (*Rysunek 5B,C*)^{35–38}. Co więcej, niska reaktywność Pro-tRNA^{Pro} nie jest zależna od pochodzenia tRNA lub kodonu dla proliny w mRNA, ale raczej od właściwości pierścienia proliny^{37,38}. Charakterystyczne właściwości chemiczne Pro powodują, że w nieoptymalnym kontekście Pro może znacząco zredukować szybkość biosyntezy białka lub nawet spowodować zatrzymanie rybosomu – tak zwany „stalling” rybosomalny.



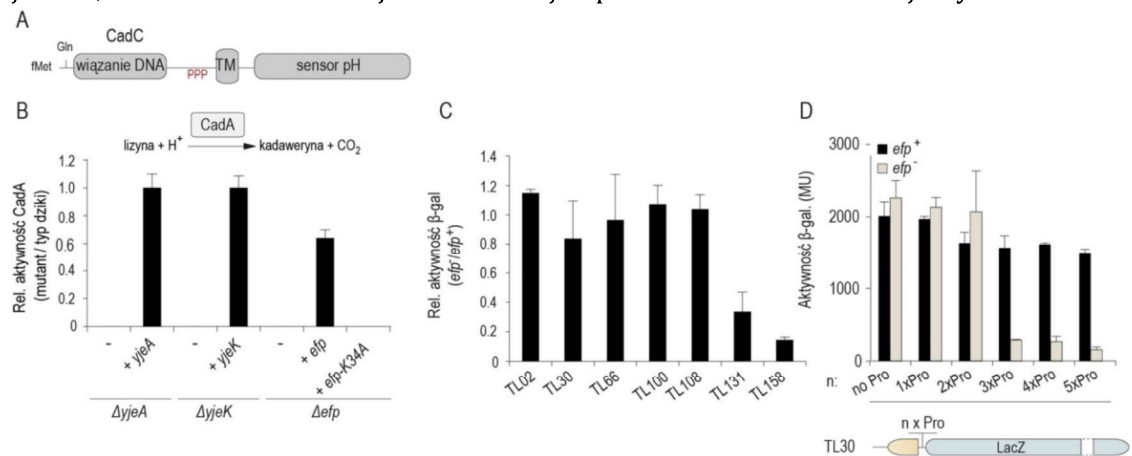
Rysunek 5. (A) Prolina jest iminokwasem. (B-C) wiązanie peptydowe pomiędzy dwiema prolinami. Zmodyfikowane źródło²⁷.

Funkcja czynnika elongacyjnego EF-P (Artykuł 1)

Pomimo dekad badań nad rolą czynnika elongacyjnego EF-P, rola tego białka w translacji pozostała nieodkryta aż do 2013 roku, gdy to grupy Profesor Kirsten Jung oraz doktora Daniela Wilsona – w których brałam aktywny udział – oraz niezależnie, zespół Profesor Mariny Rodniny, przedstawiły model wpływu EF-P na biosyntezę sekwencji poliprolinowych w syntetyzowanym polipeptydzie^{35,39}. EF-P nie jest białkiem niezbędnym do przeżycia w warunkach optymalnych dla wzrostu, ale by przetrwać zmienne warunki środowiskowe, bakterie przechodzą adaptację, która często oznacza indukcję ekspresji wyspecjalizowanych białek. I tak, zaobserwowano, że delecja genu kodującego *efp*, bądź jednego z enzymów modyfikujących EF-P – *yjeK*, *yjeA* – prowadzi do defektów: we wzroście bakterii^{40,41} zdolności adaptacyjnych⁴², integralności błon komórkowych^{40,41}, odpowiedzi na stres³⁹, sporulacji⁴³, motoryce^{41,44,45}, wywiera liczne efekty fenotypowe oraz wpływa na

Autoreferat

zmiany w oporności na antybiotyki, zdolność kolonizacji i wirulencję^{25,40,46–50}. Nie mniej jednak, wiedza ta nie dawała jednoznacznej odpowiedzi odnośnie funkcji czynnika EF-P.



Rysunek 6. (A) CadC jest białkiem trans-membranowym z cytoplazmatyczną domeną wiążącą DNA oraz peryplazmatyczną domeną monitorującą zmiany pH. (B) Relatywna aktywność CadA. (C) Relatywna aktywność chimery β -galaktozydazy z pierwszymi 2, 30, 66, 100, 108, 131 lub 158 aminokwasami z CadC. (D) Aktywność chimery β -galaktozydazy z pierwszymi 30-tu aminokwasami z CadC i poprzedzonych 1, 2, 3, 4 lub 5xPro. Zmodyfikowane źródło³⁹.

Przełomem w rozumieniu mechanizmu funkcjonowania EF-P nastąpił w czasie badań nad receptorem pH – CadC, którego zadaniem jest regulacja odpowiedzi na stres związany z zakwaszeniem środowiska. CadC jest białkiem membranowym, które posiada domenę pełniącą funkcję sensora niskiego pH oraz wysokiego stężenia lizyny w środowisku zewnętrznym (Rysunek 6A). Zaś swoją aktywność manifestuje poprzez domenę cytoplazmatyczną i wiąże się z aktywnością transkrypcyjną w indukcji operonu *cadBA*, kodującego antyporter CadB dla kadaweryny/lizyny oraz dekarboksylazę lizyny CadA.

CadC (aktywator transkrypcyjny) → antyporter *CadB* + dekarboksylaza lizyny *CadA*

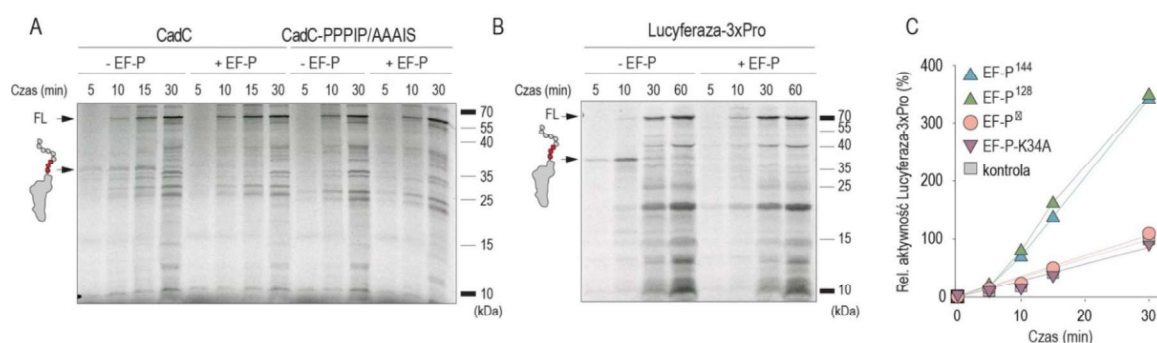
W celu identyfikacji nowych elementów regulatorowych CadC przeprowadzono mutagenezę z wykorzystaniem transpozonu i zidentyfikowano sekwencje w genie *yjeK* dającą negatywny fenotyp CadA – którego miarą jest dekarboksylacja lizyny (Rysunek 6B)³⁹. Ponieważ YjeK bierze udział w modyfikacji czynnika elongacyjnego EF-P, przetestowano również jak delecja genów *yjeA* i *efp* wpływa na aktywność CadA. Konsekwentnie, obserwowano brak aktywności dekarboksylacji lizyny przez CadA. Efekt ten był niwelowany poprzez ekspresję odpowiedniego genu *in trans* (Rysunek 6B)³⁹. Co więcej, ekspresja mutantu EF-P z substytucją lizyny K34 na alaninę, nie przywracała aktywności CadA³⁹ (Rysunek 6B). Następnie, sprawdzono czy obecność modyfikowanego EF-P wpływa bezpośrednio na ekspresję CadA. Używając β -galaktozydazy w połączeniu z CadA, pod kontrolą promotora CadC zamiast natywnego promotora *cadBA* w celu wykluczenia wpływu na transkrypcję *cadBA*. Poziom ekspresji pozostał niezmienny w szczepie z delecją *efp* w porównaniu do szczepu dzikiego³⁹. Następnie sprawdzono, czy efekt negatywnego fenotypu CadA jest spowodowany obniżeniem poziomu translacji czynnika transkrypcyjnego CadC. Używając metody Western Blot do wykrycia białka CadC, pokazano, że brak genów kodujących *efp*, *yjeK* lub *yjeA* znacząco obniża stężenie białka CadC w komórce, co w konsekwencji powoduje niższą aktywację operonu *cadBA* i negatywny fenotyp CadA³⁹. Sprawdzono również poziom mRNA kodującego *cadC* i pozostał on niezmienny w szczepie dzikim oraz w szczepach pozbawionych *efp*, *yjeK* lub *yjeA*, co

Autoreferat

jednoznacznie wskazuje na efekt EF-P na poziomie translacyjnym a nie transkrypcyjnym³⁹. Wpływ EF-P na ekspresję CadC testowano używając hybryd wariantów CadC o różnej długości (2-158 aminokwasów) i β -galaktozydazy w celu ustalenia regionu CadC zależnego of EF-P (*Rysunek 6C*). Ekspresję tak zaprojektowanych konstruktów prowadzono w szczepie dzikim oraz szczepie pozbawionym *efp*. Nie odnotowano różnic poziomu dla ekspresji β -galaktozydazy w konstruktach, gdzie wykorzystano pierwsze 2, 30, 66, 100 lub 108 aminokwasów³⁹. W przeciwieństwie do tego wyniku, ekspresja konstruktów o długości 131 oraz 158 była obniżona w szczepie *efp* sugerując, że pomiędzy aminokwasami 108 i 131 CadC znajduje się motyw, którego biosynteza jest zależna od obecności czynnika EF-P³⁹. W rejonie tym zlokalizowany jest klaster poliprolinowy – Pro¹²⁰-Pro¹²¹-Pro¹²²-Ile¹²³-Pro¹²⁴ – który, ze względu na charakter proliny będącej słabym substratem do tworzenia wiązania peptydowego, sugeruje, że biosynteza tego fragmentu też może być problematyczna dla maszynery biosyntezy białk³⁹. Żeby sprawdzić tą hipotezę, klaster poliprolinowy został zmutowany poprzez pojedynczą substytucję na pozycji 121 (PPPIP → PAPIP) lub poprzez całkowitą substytucję klastra (PPPIP → AAAIS) co spowodowało, że ekspresja CadC była zależna of EF-P w sposób znikomy lub żaden³⁹. Zostało to potwierdzone metodą Western Blot wykonaną na natywnym białku z wprowadzonymi mutacjami, jak i na aktywności β -galaktozydazy w formie chimery z pierwszymi 158 aminokwasami CadC oraz odpowiednimi substytucjami klastra prolinowego³⁹. Aby zdefiniować minimalną sekwencję, na której następuje pauza rybosomalna, przetestowano konstrukt z β -galaktozydazą, gdzie enzym jest poprzedzony trzydziesto-aminokwasowym fragmentem CadC, po którym umieszczono 1, 2, 3, 4 lub 5 reszt prolinowych. Mierzac aktywność β -galaktozydazy *in vivo* ustalono, że biosynteza co najmniej trzech następujących po sobie prolin jest ściśle zależna od obecności czynnika EF-P (*Rysunek 6D*).

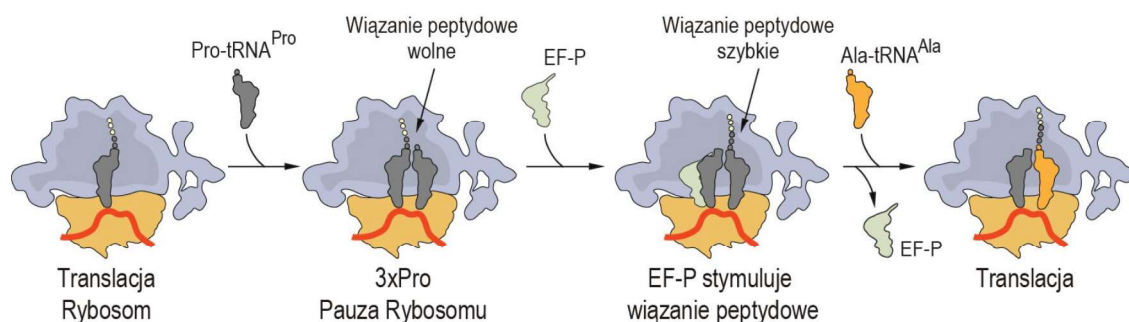
Następnie przeprowadziłam analizy aktywności EF-P *in vitro*. W tym celu użyłam systemu biosyntezy białka *in vitro* otrzymanego na bazie oczyszczonych, podstawowych elementów maszynery translacyjnej (PURExpress, New England Biolabs). Zaletą tego systemu jest brak obecności system czynnika EF-P, co umożliwia testowanie jego aktywności w biosyntezie białka. Monitorowano ekspresję CadC poprzez inkorporację radioaktywnie znakowanej [³⁵S]-Metioniny³⁹. Postęp translacji mRNA *cadC* obserwowałam na żelu poliakrylamidowym zbierając próbki w różnych odstępach czasu (*Rysunek 7A*). Zaobserwowałam produkt białkowy odpowiadający wielkością dojrzałemu białku CadC, ale jednocześnie odnotowałam produkt o pośrednim rozmiarze, który wielkością odpowiadał fragmentowi CadC, który uległ biosyntezie do klastra poliprolinowego, powiększony o 20 kDa odpowiadające masie tRNA – innymi słowy zaobserwowałam peptydylowy-tRNA (*Rysunek 7A*). Obserwację tą potwierdziłam używając syntetycznego mRNA kończącego się po kodonie Pro¹²⁴, w obecności i przy braku nukleazy RNAzy A, która usuwa tRNA z reakcji i pozwala na obserwację natywnego fragmentu polipeptydu. Wynik ten sugeruje pauzę rybosomu. W testach *in vitro* w obecności modyfikowanego EF-P nie zaobserwowałam produktu pośredniego, co jest w zgodzie z hipotezą, że EF-P jest odpowiedzialny za stymulację biosyntezy sekwencji poliprolinowych. Zahamowania pracy rybosomu nie obserwowałam podczas ekspresji mutantów CadC pozbawionych klastra poliprolinowego, niezależnie od obecności lub braku EF-P w reakcji.

Autoreferat



Rysunek 7. (A-B) Autoradiogram żeli poliakrylamidowych przedstawiający rozdział reakcji translacji *in vitro* mRNA kodującego: (A) CadC lub CadC z mutacją PPPIP::AAAIS, w obecności lub przy braku czynnika EF-P (B) Lucyferazy z motywem poliprolinowym. Zaznaczono białko pełnej długości CadC (FL) oraz peptydylowy-tRNA produktu „stallingu” rybosomalnego. (C) Relatywna aktywność Lucyferazy z motywem poliprolinowym w obecności wariantów czynnika EF-P (brak modyfikacji, modyfikacja 128 Da, 144 Da, mutacja K34A). Zmodyfikowane źródło³⁹.

Aby potwierdzić uniwersalny charakter zaobserwowanego zjawiska tzw. pauzy rybosomalnej na motywach poliprolinowych, przygotowałam konstrukt genetyczny na bazie lucyferazy (*Lampyridae*) z trzema prolinami na pozycjach 173-175 w sekwencji aminokwasowej tego białka. W przeprowadzonym teście *in vitro* i przy braku EF-P zauważyłam obecność formy pośredniej odpowiadającej wielkością fragmentowi klastra prolinowego powiększonego o 20 kDa charakterystycznego dla tRNA (Rysunek 7B), co potwierdziłam używając syntetycznego fragmentu mRNA kończącego się po kodonie Pro¹⁷⁵, w obecności i przy braku RNAzy A. W reakcjach gdzie EF-P było obecne, nie zaobserwowałam formy pośredniej, a jedynie dojrzałe białko lucyferazy (Rysunek 7B). Co więcej testowałam wpływ modyfikacji na aktywność stymulacji biosyntezy sekwencji poliprolinowych. Mierzac chemiluminescencję lucyferazy w reakcjach z EF-P: (I) niezmodyfikowanym, (II) zmodyfikowanym przy udziale YjeK i YjeA (modyfikacja 128 Da: $\epsilon(R)$ - β -lizylo-lizyna) (III) zmodyfikowanym przy udziale YjeK, YjeA i YfcM (modyfikacja 144 Da: $\epsilon(R)$ - β -lizylo-hydroksylizyna) oraz (IV) mutantem K34A (Rysunek 7C)³⁹ zaobserwowałam wzrost chemiluminescencji lucyferazy jedynie w obecności zmodyfikowanego EF-P. Odnotowałam, że modyfikacja $\epsilon(R)$ - β -lizylo-lizyna jest wystarczająca dla aktywności czynnika EF-P, co sugeruje, że hydroksylacja nie jest istotna dla aktywności czynnika EF-P³⁹. Moje wyniki są zgodne z wynikami *in vivo* pokazującymi podobny fenotyp dla delecji *efp*, jak i *yjeK* lub *yjeA*. Pozwala to stwierdzić, że modyfikowane EF-P jest aktywną formą. Uniwersalność założenia przetestowałam również dla innych białek z *E. coli* posiadających klaster poliprolinowy: FlhC, Flk czy RzoR, dla których również obserwowałam pauzę rybosomalną na motywach poliprolinowych gdy czynnik EF-P był nieobecny w reakcji. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że biosynteza białka posiadającego motyw poliprolinowy jest zależna od obecności modyfikowanego czynnika EF-P w reakcji³⁹.

Autoreferat

Rysunek 8. Czynniki elongacyjne EF-P stymuluje wiązanie peptydowe między prolinami poliprolinowych. Zmodyfikowane źródło²⁷.

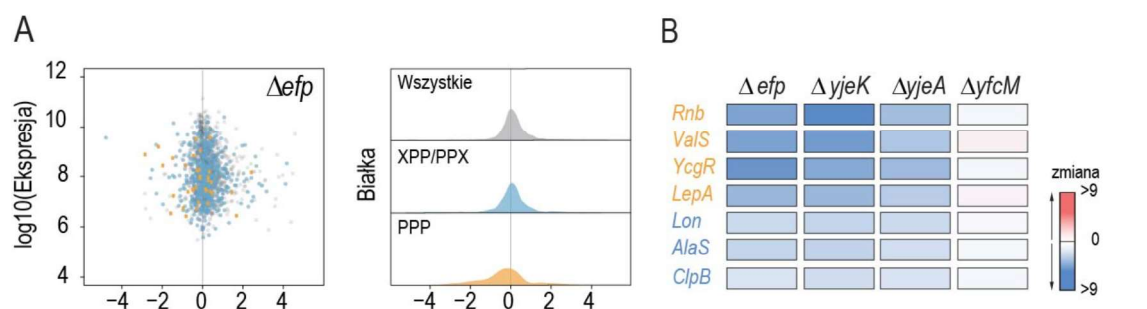
Podsumowując, rolę czynnika elongacyjnego EF-P związana jest z umożliwieniem wydajnej syntezy polipeptydu zawierającego sekwencje poliprolinowe (Rysunek 8). Gdy w czasie biosyntezy białka brakuje czynnika EF-P, rybosom zatrzymuje się i następuje tak zwany pauza rybosomu. Obecność czynnika EF-P w czasie biosyntezy białka umożliwia efektywną syntezę motywów poliprolinowych. Natomiast, jak ustaliłam, aktywność czynnika EF-P jest determinowana obecnością modyfikacji post-translacyjnej, co oznacza, że białko bez modyfikacji nie posiada zdolności stymulacji wiązania peptydowego w sekwencjach poliprolinowych^{35,39}.

Pauza rybosomalna na motywach diprolinowych (Artykuł 2)

Analizy wykonane w grupie pod kierownictwem Profesor Mariny Rodniny³⁵, pokazały że nie tylko motyw z minimum trzema prolinami (Pro-Pro-Pro: PPP) może powodować pauzę rybosomalną, ale również dwie reszty prolinowe po których następuje glicyna (Pro-Pro-Gly: PPG) powodują trudności w biosyntezie białka i pauzę rybosomu³⁵. Co więcej, w badaniach *in vitro* w systemie pozbawionym czynnika EF-P, obserwowano „stalling” na szeregu wariantach sekwencji prolinowych: PPA, PPD, PPN, PPW, APP oraz WPP⁵¹. Jednak w badaniach tych nie analizowano wpływu EF-P na biosyntezę tych motywów. Analizując dane z translatomu – pochodzące z analiz aktywnie tłumaczonych mRNA, tzw. „ribosome profiling” – zauważono, że sekwencje prolinowe takie jak PPP, PPG, PPD czy PPE powodują pauzę rybosomów, nawet pomimo obecności czynnika EF-P, bądź jego eukariotycznego odpowiednika IF5A^{52,53}.

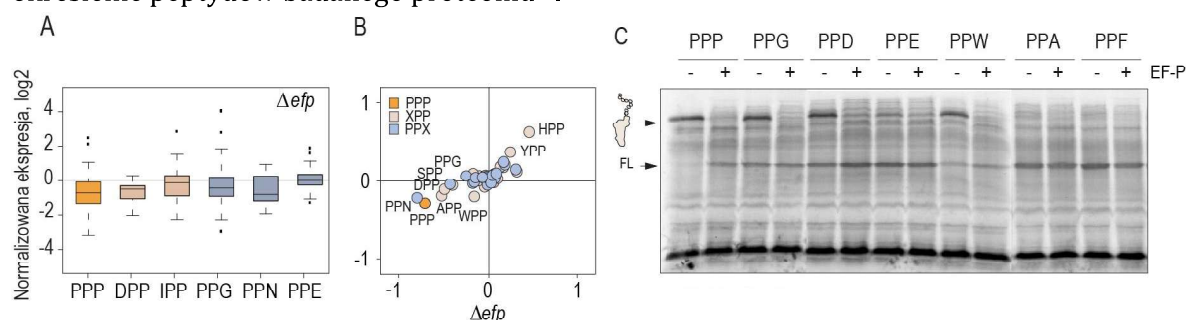
W celu ustalenia roli czynnika EF-P w biosyntezie białka u *Escherichia coli* poddaliśmy analizie proteom wyizolowany ze szczepów z delecją genu *efp*, *yjeK*, *yjeA* lub *yfcM*, w porównaniu do proteomu wyizolowanego ze szczepu dzikiego. Używając metody SILAC (ang. *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) – stabilnego znakowania izotopami wprowadzonymi poprzez aminokwasy – w połączeniu ze spektrometrią mas o wysokiej rozdzielczości ustaliliśmy poziom ekspresji białek dla każdego z analizowanych szczepów. Zaobserwowaliśmy, iż obniżeniu ulega ekspresja nie tylko białek posiadających motywy poliprolinowe złożone z minimum trzech reszt prolinowych, ale również subpopulacja białek posiadających motywy składające się z dwóch prolin (Pro-Pro).

Autoreferat



Rysunek 9. (A) Dystrybucja ekspresji genów w szczepie z delecją genu *efp* w porównaniu do szczepu dzikiego. (B) Ekspresja wybranych genów. Żółte – białka posiadające klaster PPP, niebieski – białka posiadające klaster XPPX. Zmodyfikowane źródło⁵⁴.

W badaniach SILAC wykorzystaliśmy mutanty niezdolne do wzrostu na pożywce pozbawionej argininy i lizyny ($\Delta lysA/\Delta argA$). Mutanty bakteryjne były hodowane w pożywce suplementowanej lizyną $K0-^{12}C_6^{14}N_2$ i arginina $R0-^{12}C_6^{14}N_4$, zaś szczep dziki był hodowany w obecności izotopów lizyny $K8-^{13}C_6^{15}N_2$ oraz argininy $R10-^{12}C_6^{14}N_4$. Zmieszanie próbek mutantu z próbką ze szczepu dzikiego w stosunku 1:1 pozwoliło na ilościowe określenie peptydów badanego proteomu⁵⁴.

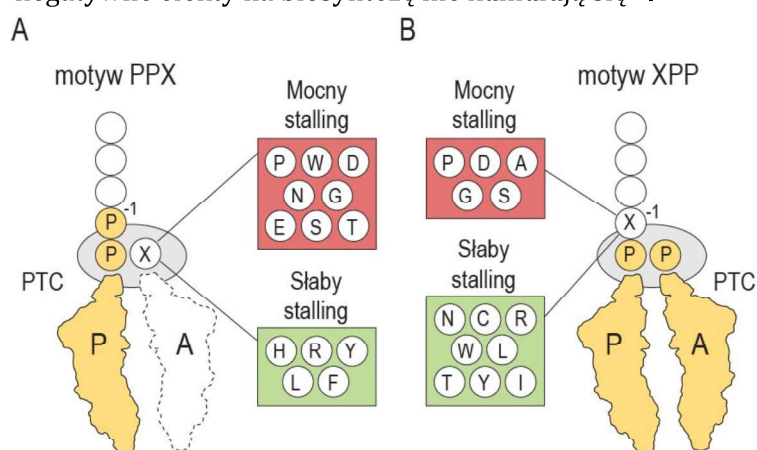


Rysunek 10. Analizy SILAC proteomu (A) Dystrybucja ekspresji genów kodujących białka posiadających wyselekcjonowane motywy PPP (pomarańczowy), XPP (beżowy), PPC (niebieski). (B) Średnia ekspresja białek posiadających klaster XPP/PPX w dwóch powtórzeniach biologicznych szczepu z delecją genu *efp*. Moje analizy biosyntezy lucyferazy in vitro: (C) Autoradiogram żelu poliakrylamidowego przedstawiający rozdział reakcji translacji in vitro, w obecności lub przy braku czynnika EF-P, mRNA kodującego lucyferazę z motywem PPP lub PPX. Zmodyfikowane źródło⁵⁴.

Zgodnie z oczekiwaniami, w grupie białek o silnie obniżonym poziomie ekspresji znalazły się białka posiadające tryplet prolinowy Pro-Pro-Pro (PPP) (Rysunek 9A). Odnotowano silną korelację między wynikami dla szczepów Δefp , $\Delta yjeK$, $\Delta yjeA$ – w granicy 80-87% – co jest zgodne z obserwacją, że modyfikacja EF-P 128 Da jest krytyczna dla funkcji tego czynnika⁵⁴. W przeciwieństwie do tych wyników, szczep $\Delta yfcM$ wykazuje niską korelację z pozostałymi mutantami – co jest zgodne z obserwacją, że hydroksylacja nie wpływa na zmianę aktywności czynnika EF-P⁵⁴. W genomie bakterii *E. coli* znajduje się 96 białek zawierających klaster trzech prolin. W badaniach proteomicznych wykryliśmy 44 z tych białek i zgodnie z oczekiwaniami, ekspresja wielu tych białek była obniżona w szczepach bez aktywnego czynnika EF-P (Δefp , $\Delta yjeK$, $\Delta yjeA$)⁵⁴. Zastanawiająco, hierarchiczne zestawienie poziomu ekspresji dla 1149 wykrytych białek pogrupowało wiele białek nieposiadających motywu PPP z białkami, który ten motyw posiadają, takimi jak Rnb, ValS, YcgR czy LepA (Rysunek 9B)⁵⁴. Sugeruje to, że albo ekspresja tych białek jest pośrednio regulowana przez białka, które posiadają motyw prolinowy, albo że są one bezpośrednio regulowane przez czynnik EF-P. Z racji tego, że EF-P reguluje nie tylko ekspresję motywu PPP ale również PPG³⁵, sprawdziliśmy ten motyw oraz inne, które

Autoreferat

zostały zasugerowane, jako podatne na działanie czynnika EF-P: PPA, PPD, PPN, PPW, PPE oraz APP i WPP⁵¹⁻⁵³. Tak rozszerzona pula motywów (XPP/PPX) została zidentyfikowana w niemal 80% białek, których ekspresja została przez nas zidentyfikowana w danych proteomicznych⁵⁴. W sumie, wykryliśmy 734 białka, które zawierały 747 motywów XPP/PPX – z wykluczeniem motywu PPP⁵⁴. Inaczej niż dla białek z motywem PPP, dystrybucja poziomu ekspresji białek z motywem XPPX dla szczepów Δefp , $\Delta yjeK$, $\Delta yjeA$, nie różniła się pod względem dystrybucji ekspresji od wartości obserwowanych dla $\Delta yjcM$ (Rysunek 9A)⁵⁴. Sugeruje to, że jedynie niektóre XPP i/lub PPX motywy są problematyczne dla maszynierii translacyjnej i wymagają obecności aktywnego EF-P. Dlatego też przeanalizowaliśmy poziom ekspresji białek indywidualnie dla każdego z dwudziestu wariantów dla motywów PPX oraz dla dwudziestu wariantów motywu XPP. Używając motywu PPP jako referencji – ekspresja tych białek jest silnie obniżona w Δefp , $\Delta yjeK$, $\Delta yjeA$, ale nie w $\Delta yjcM$ – stwierdziliśmy podobny trend dla białek z motywami: DPP, IPP, APP, PPG oraz PPN (Rysunek 10A, B)⁵⁴. Następnie przetestowaliśmy efektywność pauzy rybosomalnej *in vivo* używając konstruktów z β -galaktozydazą jako białkiem reporterowym, gdzie enzym jest poprzedzony trzydziesto-aminokwasowym fragmentem CadC, po którym umieszczono motyw prolinowy XPP lub PPX. Mierząc aktywność β -galaktozydazy *in vivo* ustalono, że najbardziej problematyczne dla aparatu biosyntezy białka są sekwencje: PPP, DPP, PPW, PPD, APP, PPN, PPG i PPE⁵⁴, co koreluje z danymi z proteomiki⁵⁴. Aby potwierdzić wyniki analiz proteomu i wyniki eksperymentów *in vivo*, przeprowadziłam testy *in vitro* z użyciem konstruktów lucyferazy z motywem XPP/PPX na pozycji 173-175. Zaobserwowałam pauzę rybosomalną na motywach poliprolinowych podczas ekspresji konstruktów posiadających sekwencję PPP, PPG, PPD, PPW, DPP, PPN czy też PPE. Zaobserwowałam obecność formy pośredniej odpowiadającej wielkością fragmentowi motywu prolinowego powiększonego o 20 kDa charakterystycznego dla tRNA (Rysunek 10C). W przeciwieństwie do tych wyników, odnotowałam brak pauzy rybosomalnej przy braku czynnika EF-P, gdy lucyferaza posiadała sekwencje PPA czy PPF⁵⁴. Co więcej, testowany przeze mnie poczwórny klaster DPPN nie powodował mocniejszej pauzy niż pojedynczy motyw DPP lub PPN co sugeruje, że negatywne efekty na biosyntezę nie kumulują się⁵⁴.



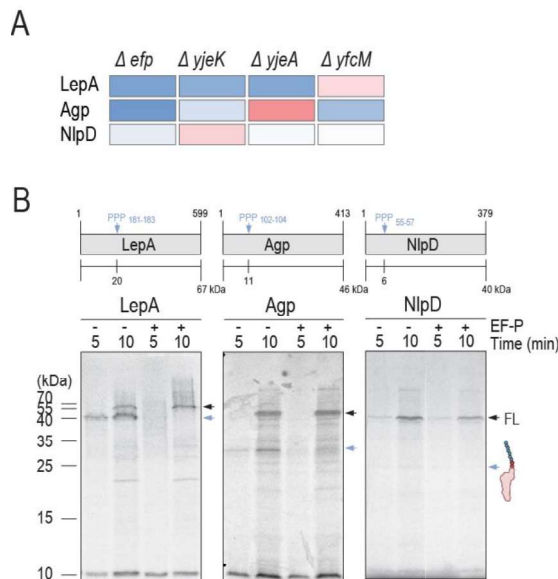
Rysunek 11. Model przedstawiający pauzę rybosomalną w czasie biosyntezy sekwencji posiadających motyw di-prolinowy PPX/XPP. Zmodyfikowane źródło⁵⁴

Podsumowując, dane *in vivo* oraz *in vitro* wskazują, że nie tylko motyw PPP jest problematyczny dla maszynierii translacyjnej, ale również pewne kombinacje aminokwasów z dwiema prolinami są wystarczające, by proces translacji zwolnił i stał się zależny od obecności aktywnego czynnika EF-P. Otrzymane wyniki wskazują, że nie tylko prolina (P) i glicyna (G) w miejscu A-rybosomu są słabymi substratami w procesie

Autoreferat

formowania wiązania peptydowego co powoduje pauzę rybosomalną, ale analizy wykazały, że również tryptofan (W), kwas asparaginowy (D), asparagina (N) czy kwas glutaminowy (E) są problematyczne w czasie biosyntezy białka (Rysunek 11)⁵⁴. Co więcej, alanina (A) oraz kwas asparaginowy (D) następujący po motywie diprolinowym powodują pauzę rybosomu⁵⁴, co znacząco zwiększa pulę białek, których ekspresja jest bezpośrednio zależna od obecności elongacyjnego czynnika EF-P.

Wpływ aminokwasów poprzedzających motyw triprolinowy na pauzę rybosomalną w czasie biosyntezy białka (Artykuł 3)



Rysunek 12. (A) Ekspresja genów w zależności od obecności modyfikowanego EF-P. Czerwony kolor oznacza nad-ekspresję, niebieski – obniżenie ekspresji, biały brak zmian w ekspresji, szary – brak detekcji. (B) Biosynteza wybranych białek posiadających klastery poli-prolinowy *in vitro*. Górny panel – schematyczna reprezentacja białek z zaznaczoną pozycją klastra PPP. Dolny panel – Autoradiogram żeli poliakrylamidowych monitorujących translację *in vitro* genów kodujących *lepA*, *agp* i *nlpD*. Pozycja białka o pełnej długości oznaczona jako FP, pozycji peptydylowy-tRNA zaznaczona. Zmodyfikowane źródło⁵⁵

Badania porównujące proteom między szczepem dzikim *Escherichia coli* a szczepami bez aktywnego czynnika EF-P (Δefp , $\Delta yjeK$, $\Delta yjeA$) pokazały obniżony poziom ekspresji wielu, ale nie wszystkich, białek z motywem triprolinowym (PPP).

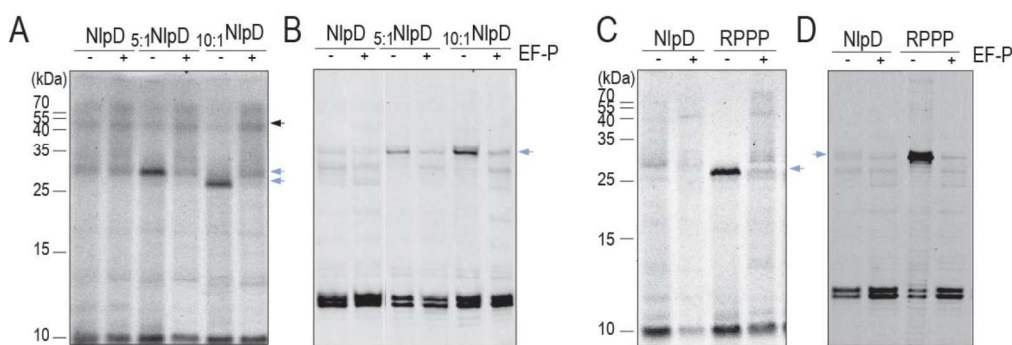
Niektóre białka z PPP ulegały nawet nadekspresji^{54,55}. Co więcej, moje analizy *in vitro* realizowane w grupie dr Wilson'a pokazy również, że gdy kwas asparaginowy (D) lub alanina (A) poprzedzają sekwencję di-prolinową (PP), powodują pauzę rybosomalną⁵⁴. Dlatego też sprawdziłam czy aminokwas poprzedzający motyw tri-prolinowy (PPP) ma wpływ na syntezę motywu PPP⁵⁵. Ekspresja takich białek jak rybonukleaza Rnb, czy też czynnik translacyjny LepA, jest silnie obniżona przy obecności czynnika EF-P, podczas gdy synteza na przykład aktywatora hydrolazy mureiny (NlpD), czy fosfataza 1-glukozy (Agp), była obniżona tylko nieznacznie lub nawet ulegała nadprodukcji przy braku aktywnego EF-P (Rysunek 12A)⁵⁵. Nadekspresja części białek z motywem PPP nie musi oznaczać, że biosynteza tych białek jest niezależna od EF-P, gdyż w badaniu *in vivo* wynik ten może być maskowany przez inne czynniki, jak na przykład zwiększoną transkrypcję mRNA kodującego to białko lub obniżony poziom degradacji mRNA⁵⁵. Dlatego też, by określić wpływ czynnika EF-P na ekspresję tych białek, przeprowadziłam analizy *in vitro* z wykorzystaniem systemu do syntezy białek złożonego jedynie z podstawowych czynników translacyjnych (z pominięciem czynnika EF-P). Przeanalizowałam syntezę pięciu białek, których poziom – przy nieobecności EF-P, YjeK lub YjeA – był najmniej zmieniony lub odnotowano ich nadekspresję: Agp, NlpD, NudC, YcgL, ClsA i porównałam wyniki do ekspresji białka LepA, którego ekspresja była obniżona przy braku EF-P (Rysunek 12B)⁵⁵. Przeprowadzałam biosyntezę tych białek w minimalnym układzie translacyjnym w obecności radioaktywnej metioniny, a postęp translacji monitorowałam używając autoradiografii żeli poliakrylamidowych. Ekspresja LepA przy braku czynnika EF-P

Autoreferat

proceeds to a ribosome pause on a triprolin motif, which is manifested by the presence of a peptidyl transferase tRNA, which marks the expression of the polypeptide chain to the PPP motif, still attached to the tRNA (*Rysunek 12B*)⁵⁵. Consistent with expectations, when in the reaction there was a modified factor EF-P, I did not observe the intermediate product, but only LepA of full polypeptide length⁵⁵. The ribosome pause dependent on the EF-P factor I observed also in the synthesis of Agp, ClsA, and to a lesser extent NudC and YcgL. The results show that the synthesis of these proteins is dependent on the active factor EF-P, despite observations from proteomic data that the expression of these proteins undergoes only minor changes or even overexpression⁵⁵. The decision otherwise looks like biosynthesis of NlpD, for which I did not observe a ribosomal pause on a triprolin motif observed as a peptidyl transferase-tRNA in the absence of the EF-P factor, but only observed a full-length protein⁵⁵. This result strongly suggests that not every PPP motif causes a ribosomal pause. To study the nature of biosynthesis of triprolin motifs, I prepared chimeras of LepA and NlpD – five and ten amino acids preceding the PPP motif I replaced between these proteins⁵⁵. Biosynthesis of these constructs I tested *in vitro* in a minimal translation system in the presence, or in the absence of the modified factor EF-P. Consistent with my previous observations, the synthesis of NlpD proceeded without interruptions on a triprolin motif. However, the chimera NlpD with five and ten amino acids preceding the PPP motif with LepA revealed a pause on the PPP motif (*Rysunek 13A*)⁵⁵. Simultaneously, I noted that biosynthesis of LepA with amino acids transferred by NlpD did not cause a ribosome pause on the PPP motif⁵⁵, which suggests the influence of the context of amino acids preceding the triprolin sequence on their ability to form a peptide bond. Next, using the so-called „toe-printing”, I analyzed the exact position of the ribosome pause on the mRNA with an accuracy of one nucleotide^{56,57}. In this method, I use reverse transcriptase to monitor the exact position between the ribosome on the mRNA and the start codon located below the ribosome pause site. I tested mRNA translation for the NlpD protein, in which the PPP cluster is located at positions 55-57 in the polypeptide chain. „Toe-printing” of NlpD showed a minimal ribosomal pause in two places on the mRNA, and indeed when the peptidyl-P⁵⁵-P⁵⁶-tRNA was located in the P-ribosome site, and the P⁵⁷-tRNA in the A site, and when the PPP-tRNA was located in the P site, the A site was occupied by the K⁵⁸-tRNA⁵⁵. The result for the NlpD chimera with five and ten amino acids with LepA looked quite different – with an effective pause of the ribosome with the peptidyl-P⁵⁵-P⁵⁶-tRNA in the P site (*Rysunek 13B*)⁵⁵. The results suggest that the amino acid preceding the triprolin motif PPP has an influence on the effectiveness of the ribosomal pause. Therefore, I also tested mRNA translation for NlpD with the PPP motif preceded by each of the twenty biogenic amino acids. Surprisingly, the strongest effect on „stalling” of the ribosome on the PPP cluster I observed in the case of the substitution of threonine T⁵⁴ by arginine R (RPPP)⁵⁵ – mutation at position -1 from the PPP cluster (*Rysunek 13C, D*). When I moved the arginine to positions from -2 to -5, I still observed its influence on the effectiveness of the ribosomal pause – the pause was more pronounced/stronger than for the original version of NlpD, but weaker than in the RPPP context, and the effectiveness of the pause decreased with the distance from the PPP motif. Moreover, unlike in the case of RPPP, where the peptidyl-P⁵⁵-P⁵⁶-tRNA in the P site and the P⁵⁷-tRNA in the A site, the ribosome pause I observed for constructs with arginine at positions -2 to -5 is shifted by one codon, with the PPP-tRNA in the P site and the P⁵⁷-tRNA in

Autoreferat

miejsu A. Podsumowując, kontekst aminokwasów poprzedzający klaster triprolinowy ma wpływ na pauzę rybosomu na mRNA – z pozycją -1 mającą największy wpływ na siłę pauzy – ale również może modulować miejsce pauzy rybosomu⁵⁵. Systematyczne testy *in vivo* ukierunkowane na analizę aminokwasu na pozycji -1 od klastera PPP z użyciem konstruktów chimer β -galaktozydazy (*lacZ*) na C-końcu z NlpD oraz CadC pozwoliły ustalić, które aminokwasy mają największy wpływ na pauzę rybosomu. I tak ustaliliśmy, że aminokwasy te to: R, H, K, W, E, Q oraz znane już z poprzednich badań nad XPP, A oraz D^{54,55}. Z drugiej strony mamy grupę aminokwasów takich jak C, T, L, G czy S, które w bardzo dużym stopniu obniżają siłę pauzy rybosomalnej na motywach PPP, przez co pozwalają na translację w sposób niemal niezakłócony i niezależny od EF-P. Należy jednak zauważyć, że analizy z wykorzystaniem NlpD oraz CadC ukazały, że dla różnych białek różne aminokwasy modulowały siłę pauzy na motywie PPP – na przykład alanina (A) poprzedzająca motyw triprolinowy miała bardzo silny wpływ na siłę „stalling’u” w CadC, ale w teście z NlpD była w grupie najsłabszych modulatorów⁵⁵. Wyniki te podkreślają, że nie tylko pozycja -1 ma wpływ na efektywność pauzy, ale również aminokwasy na pozycjach poprzedzających XPPP.



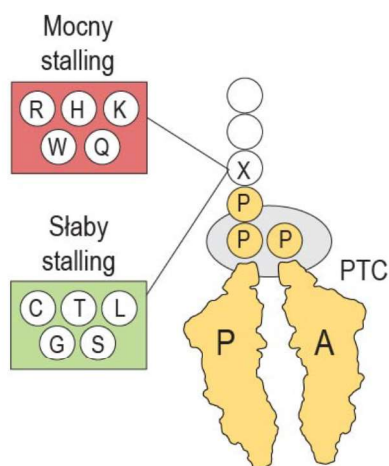
Rysunek 13. Autoradiogram żelu poliakrylamidowego przedstawiający rozdział reakcji translacji *in vitro*, w obecności lub przy braku czynnika EF-P, mRNA kodującego białko NlpD typu dzikiego, oraz pięcioma lub dziesięcioma aminokwasami poprzedzającymi motyw PPP w białku LepA: (A) monitoring całej reakcji, (B) toe-printing; Autoradiogram żelu poliakrylamidowego przedstawiający rozdział reakcji translacji *in vitro*, w obecności lub przy braku czynnika EF-P, mRNA kodującego białko NlpD typu dzikiego lub NlpD z arginina poprzedzającą motyw tri-prolinowy: (C) monitoring całej reakcji, (D) toe-printing. Czarna strzałka zaznacza białko pełnej długości. Niebieska strzałka produkt „stallingu” rybosomalnego. Zmodyfikowane źródło⁵⁵.

W porównaniu do innych aminokwasów, prolina może przyjmować dwie konformacje: *cis* oraz *trans*, a predyspozycje przyjęcia jednej z tych konformacji w peptydach i białkach są modulowane przez kontekst, w jakim znajduje się reszta prolinowa^{58,59}. Struktury 3D białek i peptydów oraz badania biofizyczne sugerują, że sąsiadujące ze sobą proliny, bądź proliny w otoczeniu aminokwasów aromatycznych, mają największą skłonność do przyjęcia konformacji *cis* w wiązaniu amidowym^{58–61}. Wyniki eksperymentalne sugerują, że duże reszty aminokwasów aromatycznych promują konformacje *cis* proliny, poprzez ustanowienie oddziaływań pomiędzy pierścieniami obu aminokwasów^{58–61}. Należy jednak pamiętać, że dostępne są dane jedynie dla białek i peptydów znajdujących się w cieczy, dlatego możemy jedynie spekulować, że podobne zjawiska zachodzą w peptydach nadal przyłączonych do tRNA oraz znajdujących się w ciasnym tunelu wyjściowym z rybosomu. I tak, wśród aminokwasów mających wpływ na wzrost pauzowania rybosomów w czasie translacji klastra poliprolinowego znajdują się aminokwasy aromatyczne: HPPP, WPPP czy YPPP, ale silną pauzę obserwujemy również,

Autoreferat

gdy aminokwas poprzedzający PPP nie należy do grupy związków aromatycznych, na przykład: R, K, D, E czy Q.

Na bazie otrzymanych wyników sugerujemy model, w którym proponujemy, że aminokwas poprzedzający motyw poliprolinowy, a mający wpływ na zwiększenie siły pauzy rybosomalnej, prawdopodobnie niekorzystnie wpływa na zdolności/konformację proliny do tworzenia wiązania peptydowego⁵⁵. Różnice siły pauzy dla różnych XPPP pomiędzy CadC oraz NlpD podkreślają, że nie tylko aminokwas na pozycji -1, ale możliwe również aminokwasy poprzedzające, modulują siłę pauzy⁵⁵. Co więcej, wyniki wskazują, że aminokwasy takie jak, na przykład: C, T, L czy S, promują korzystną dla tworzenia wiązania peptydowego konformację peptydów zawierających prolinę⁵⁵ (Rysunek 14).



Rysunek 14. Model przedstawiający „stalling” rybosomalny w czasie translacji sekwencji posiadających motyw tri-prolinowy XPPP. Zmodyfikowane źródło⁵⁵

Podsumowując, tworzenie wiązania peptydowego pomiędzy prolinami jest najwolniejsze ze wszystkich biogennych aminokwasów. Badania z wykorzystaniem analogów proliny sugerują, że głównym determinantem wolnego formowania wiązania peptydowego z udziałem proliny jest nieoptymalne pozycjonowanie Pro-tRNA w centrum peptydylo-transferazowym rybosomu⁶². Obecność aktywnego czynnika EF-P w czasie tworzenia wiązania peptydowego

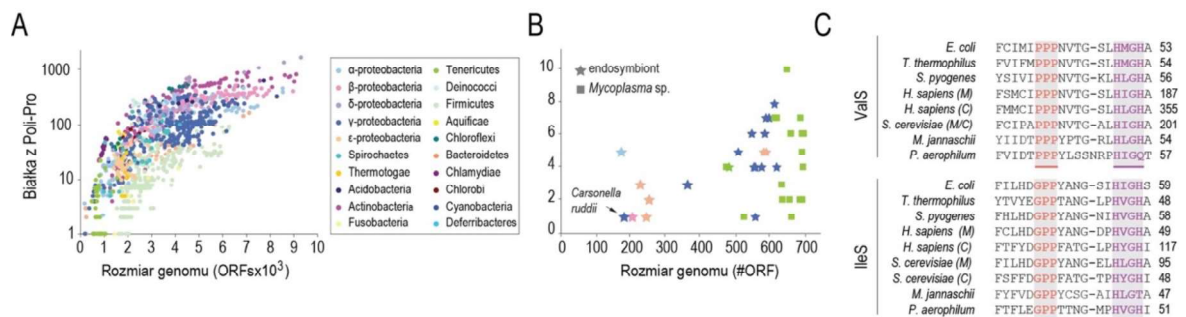
obniża energię aktywacji reakcji o około 2.5 kcal/mol⁶². Ta korzystna zmiana w entropii jest głównym źródłem katalizy wiązania peptydowego. Czynniki EF-P ukierunkowuje entropię Pro-tRNA w stronę orientacji produktywnej katalitycznie w centrum peptydylo-transferazowym rybosomu⁶².

Ewolucyjny aspekt motywu poliprolinowego (Artykuł 4)

Chociaż biosynteza sekwencji poliprolinowych jest problematyczna dla aparatu translacyjnego, sekwencje te nie zostały usunięte w wyniku negatywnej selekcji ewolucyjnej⁵⁴. Co więcej, presja ewolucyjna by podtrzymać efektywną syntezę białek z sekwencjami poliprolinowymi była na tyle duża, że natura wyselekcjonowała mechanizm w postaci czynnika EF-P wraz z ścieżką jego modyfikacji^{35,39}. Aby zrozumieć, dlaczego natura wybrała utrzymanie występowania motywów poliprolinowych, przeanalizowaliśmy genomy bakteryjne (ponad 1200 genomów zsekwencjonowanych w całości)⁶³. Analizy pokazują generalny trend mówiący o tym, że im większy genom, tym więcej białek posiadających motywy poli-prolinowe⁶³. Przykładowo, bakteria *Sorangium cellulosum* należąca do klasy *delta-proteobakterii*, która charakteryzuje się największym genomem bakteryjnym spośród wszystkich zsekwencjonowanych dotychczas⁶⁴, posiada największą liczbę białek z motywem poliprolinowym – 2406 motywów w 1773 białkach spośród wszystkich 9367 białek, co stanowi 19% proteomu bakterii (Rysunek 15A)⁶³. Dla porównania, typowy szczep laboratoryjny bakterii *Escherichia coli* K12 posiada w przybliżeniu 100 białek z motywem poliprolinowym na 4100 genów kodujących białka, co stanowi jedynie 2% wszystkich białek. Co więcej, zidentyfikowaliśmy 16 genomów bakteryjnych (w tym bakterie wolnożyjące należące do rodzaju *Mycoplasma*, jak również

Autoreferat

endosymbionty bakteryjne występujące u owadów z podrzędu *Heteroptera*), które posiadają od 182 do 2013 sekwencji kodujących białka posiadających jedynie jedno białko z motywem tri-prolinowym (*Rysunek 15B*)⁶³. Tym białkiem jest syntaza walylo-tRNA (ValS według nomenklatury dla *E. coli*)⁶³ – białko, które aminoacyluje tRNA^{Val}. Syntetaza walylo-tRNA jest białkiem koniecznym dla funkcjonowania komórki⁶⁵ i jest uniwersalne dla każdej domeny życia. Pozycja motywu triprolinowego jest niezmienna i całkowicie zakonserwowana (100%) dla każdej sekwencji bakteryjnej przez nas sprawdzonej, ale również dla 205 sekwencji ValS pochodzących z Archeonów oraz 98 sekwencji eukariotycznych (*Rysunek 15C*)⁶³. Co ciekawe, motyw PPP jest bardziej konserwatywny niż motyw HIGH, który determinuje ValS jako syntetazę klasy I⁶⁶. Nasze analizy nie wykazały istnienia żadnego innego motywu triprolinowego, który byłby zakonserwowany do tego stopnia co PPP w ValS⁶³. Drugi najbardziej konserwatywny motyw PPP występuje w czynniku translacyjnym LepA, ale jedynie 65% analizowanych białek posiada ten motyw. Co więcej, LepA nie jest niezbędne dla życia i funkcjonowania komórki⁶⁷. Z racji tego, że również motywy XPP/PPZ powodują pauzę rybosomu⁵⁴, przeanalizowaliśmy również konserwację tych motywów dla genomów bakteryjnych. Odkryliśmy tylko jeden motyw – GPP w sekwencji kodującej IleS, syntetazy izoleucylo-tRNA aminoacylującej tRNA^{Ile} (*Rysunek 15C*), który jest konserwatywny nie tylko u bakterii, ale podobnie jak ValS, we wszystkich domenach życia⁶³. Położenie i lokalizacja motywu GPP w IleS jest analogiczna do motywu PPP w ValS, i również znajduje się w sąsiedztwie motywu HIGH. W poprzednich badaniach wykazaliśmy, że pauza rybosomalna na motywach GPP, gdy brakuje czynnika EF-P, jest słabsza w porównaniu do pauzy na motywie PPP⁵⁴.

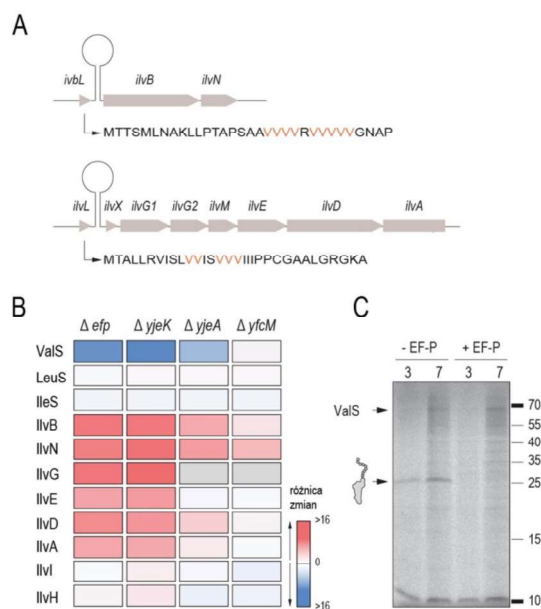


Rysunek 15. (A) Dystrybucja liczby białek z klastrami poliprolinowymi w zależności od wielkości genomów bakterii. (B) Zoom (A) bakterie z najmniejszym genomem. (C) Dopasowanie sekwencji ilustrujące konserwację motywu poliprolinowego PPP oraz GPP w syntetazie Val-tRNA oraz Ile-tRNA. Zmodyfikowane źródło⁶³

Mając zidentyfikowane białko ValS jako potencjalny powód istnienia całej maszynierii umożliwiającej efektywną translację sekwencji poliprolinowych, sprawdziliśmy zależność ekspresji mRNA *valS* od obecności aktywnego czynnika EF-P. W pierwszej kolejności przeanalizowaliśmy nasze uprzednio opublikowane dane proteomiczne dla szczepów nieposiadających EF-P, YjeK, YjeA lub YfcM (Δ *efp*, Δ *yeK*, Δ *yeA*, Δ *yfcM*) w porównaniu do szczepu dzikiego⁵⁴. Jak można było przewidzieć, ekspresja białka ValS jest silnie obniżona gdy w komórce brakuje aktywnego czynnika EF-P w Δ *efp*, Δ *yeK*, Δ *yeA* (*Rysunek 16B*). Natomiast brak YfcM nie ma wpływu na ekspresję ValS⁶³, co jest zgodne z obserwacją, że końcowa hydroksylacja lizynyłowanego EF-P nie wpływa na jego aktywność^{26,35,39}. Ponieważ nie obserwujemy obniżenia ekspresji innych syntetaz tRNA, takich jak LeuS i IleS, zakładamy, że wpływ braku EF-P na translację genu *valS* jest

Autoreferat

specyficzny i jest efektem bezpośrednim (Rysunek 16B)⁶³. Brak silnego efektu braku czynnika EF-P na ekspresję IleS jest zgodny z naszymi wcześniejszymi obserwacjami, że motyw GPP powoduje tylko nieznaczną pauzę rybosomu i nie ma silnego wpływu na ekspresję białka⁵⁴, co obserwujemy jako dwukrotne obniżenie poziomu ekspresji IleS w porównaniu do dwudziestokrotnego obniżenia ekspresji ValS posiadającej klastery PPP⁵⁴.



Rysunek 16. (A) Schematyczna ilustracja genów w operonie *ivbL-BN* oraz *ilvL-GMEDA* wraz z sekwencją peptydów liderowych. Sekwencja aminokwasowa determinująca atenuację zaznaczono kolorem czerwonym. (B) Ekspresja genów w zależności od obecności modyfikowanego EF-P. Czerwony kolor oznacza nad-ekspresję, niebieski – obniżenie ekspresji, biały brak zmian w ekspresji, szary – brak detekcji. (C) Autoradiogram przedstawia żel poliakrylamidowy monitorujący

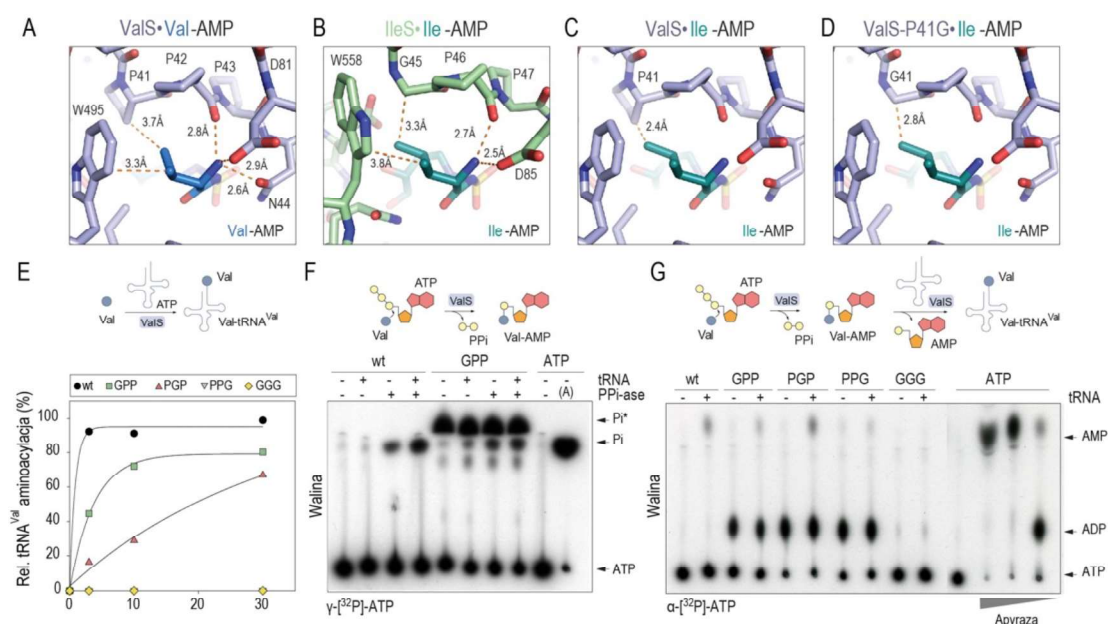
translację *in vitro* po 3, 7 min mRNA kodującego *valS*, w obecności i przy braku EF-P. Białko ValS oraz peptydylowy-tRNA są zaznaczone strzałkami. Zmodyfikowane źródło⁶³

Co ciekawe, zaobserwowałam nad-ekspresję białek z dwóch operonów związanych z biogenezą izoleucyny, leucyny i waliny, a mianowicie: *ilvBN* oraz *ilvGEDA*⁵⁴, co może być wytłumaczone

atenuacją transkrypcji (Rysunek 16A, B)⁶⁸. Gdy aminokwas taki jak walina jest czynnikiem limitującym translację – to znaczy, gdy stężenie tego aminokwasu wyraźniej spada – wiąże się to z obniżoną dostępnością acetylowanego Val-tRNA^{Val}. Skutkuje to pauzą rybosomu na bogatych w waliny sekwencjach liderowych *IvbL* oraz *IlvL* poprzedzających geny odpowiedzialne za biosyntezę aminokwasu (Rysunek 16A, B). W konsekwencji rybosom zapobiega tworzeniu terminatora transkrypcji na 3' końcu mRNA kodującego peptyd liderowy, co prowadzi do indukcji transkrypcji i translacji genów w operonie znajdującym się poniżej sekwencji liderowych⁶⁸. Podobne efekt zwiększonej indukcji transkrypcji i translacji genów biosyntezy aminokwasów rozgałęzionych ma spadek dostępności aminoacylowanego Val-tRNA^{Val} spowodowany obniżeniem stężenia enzymu ValS w komórce, co wyjaśnia zwiększoną indukcję operonów *ilvBN* oraz *ilvGEDA* przy braku czynnika EF-P.

Następnie, monitorując inkorporację znakowanej izotopowo [³⁵S] metioniny sprawdziłam ekspresję *valS* *in vivo* w minimalnym układzie translacyjnym. Postęp reakcji monitorowałam poprzez autoradiografię żeli poliakrylamidowych, na których były rozdzielane produkty reakcji translacji. Przy braku czynnika EF-P w czasie translacji genu *valS* zaobserwowałam obecność produktu o wielkości 25 kDa, co odpowiada wielkości polipeptydu ValS, który uległ biosyntezie do motywu PPP (~5 kDa), a nadal połączony z tRNA (~20 kDa), tak zwany peptydylowy-tRNA (Rysunek 16C)⁶³. W obecności EF-P produkt pauzy rybosomu jest nieobecny, co potwierdza zależność translacji białka ValS od obecności czynnika EF-P⁶³. Obserwację tą potwierdziłam testem „toe-print”, z którego wynika że w nieobecności czynnika EF-P rybosom zatrzymuje się z peptydył-PP-tRNA w miejscu P-rybosomu i P-tRNA w miejscu A⁶³. Wynik ten potwierdza przypuszczenie, że ekspresja enzymu ValS jest zależna od obecności aktywnego czynnika EF-P w procesie translacji.

Autoreferat



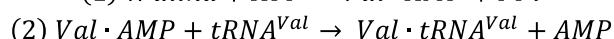
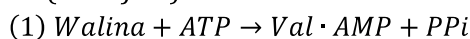
Rysunek 17. Klaster poli-prolinowy w centrum aktywnym syntetazy walylo-tRNA. (A) lokalizacja klastra PPP w syntetazie ValS – pdb: 1GAX⁶⁹. (B) Centrum aktywne syntetazy IleS – pdb: 1JZG⁷⁰. (C) Struktura centrum aktywnego ValS z (A) z nałożoną strukturą Ile-AMP z (B). (D) Eksperyment jak w (C) z mutacją in silico P41G. (E) Relatywna aminoacylacja tRNA^{Val} waliną. (F-G) Autoradiogram płytki rozdzielu chromatograficznego reakcji aminoacylacji tRNA^{Val} waliną z użyciem (F) γ -[³²P]ATP (G) α -[³²P]ATP. PPI-ase – pirofosfataza, Wzrastające stężenie apyrazy użyto w celu uzyskania AMP i ADP jako wzorca. Zmodyfikowane źródło⁶³

Zakładając, że czynnik EF-P wyewoluował w celu zachowania motywu triprolinowego w sekwencji syntetazy walylo-tRNA, oczekujemy, że motyw ten powinien znajdować się w miejscu krytycznym dla funkcji enzymu. Dostępna struktura 3D syntetazy ValS z bakterii *Thermus thermophilus*^{69,71} ukazuje trzy proliny (odpowiednik P41-P43 u *E. coli*) w centrum aktywnym enzymu – czyli w miejscu aktywacji walinę cząsteczką ATP, aby utworzyć walylo-AMP, które następnie jest przenoszone na tRNA^{Val}^{69,71}, by utworzyć Val-tRNA^{Val}. Pro⁴¹ w centrum katalitycznym ValS koordynuje grupę metylową γ -1-CH₃ walylo-AMP, podczas gdy Pro⁴² oraz Pro⁴³ koordynują stabilne wiązanie walylo-AMP w miejscu aktywnym poprzez tworzenie wiązania wodorowego pomiędzy grupą karbonylową α -CO z Pro⁴², a grupą aminową α -NH₃ z walylo-AMP (Rysunek 17A)^{69,71}. Co ciekawe, w centrum aktywnym syntetazy izoleucylo-tRNA substytucja proliny glicyną (GPP) pozwala na akomodację izoleucylo-AMP (Rysunek 17B)^{72,73}. Obecność trzech prolin w centrum aktywnym ValS praktycznie uniemożliwia akomodację Ile-AMP ze względu na ograniczenie głębokości centrum aktywnego, co stało się podstawą hipotezy, że rolą Pro⁴¹ w centrum aktywnym jest dyskryminacja pomiędzy waliną i izoleucyną⁶⁹ i zapewnienie jednego z mechanizmów zapobiegających inkorporacji błędnego aminokwasu (Rysunek 17C). Jedną z hipotez powstałych na podstawie struktur przestrzennych enzymów IleS i ValS zakłada, że substytucja P41::G41 powinna podnieść poziom błędnej aminoacylacji tRNA^{Val} izoleucyną (Rysunek 17D). W celu weryfikacji roli prolin w centrum aktywnym syntetazy walylo-tRNA, przygotowałam serię mutantów z pojedynczą substytucją P:G (GPP, PGP, PPG) oraz potrójny mutant PPP:GGG. Wykorzystując radioaktywnie znakowaną [¹⁴C]walinę, oczyszczone tRNA^{Val} i oczyszczoną przeze mnie syntetazę ValS, przetestowałam zdolność mutantów enzymu ValS do acetylacji waliną tRNA^{Val} w porównaniu do enzymu typu dzikiego⁶³. W warunkach eksperymentalnych w 37°C, odnotowałam maksymalną acetylację

Autoreferat

tRNA^{Val} radioaktywnie znakowaną [¹⁴C]waliną w ciągu pierwszej minuty reakcji (*Rysunek 17E*). Każdy z mutantów przez mnie testowany wykazywał mniejszą efektywność w aminoacylacji tRNA^{Val} niż dziki enzym ValS, a ValS-PPG oraz ValS-GGG były całkowicie pozbawione aktywności (*Rysunek 17E*)⁶³.

W dwustopniowej reakcji aminoacylacji tRNA walina jest aktywowana przez ATP i tworzy się Wal-AMP oraz zostaje uwolniony piroforsoran (*reakcja 1*). Następnie, aktywowana walina jest przenoszona na tRNA^{Val}, czego konsekwencją jest powstanie Val-tRNA^{Val} oraz uwolnienie AMP (*reakcja 2*).

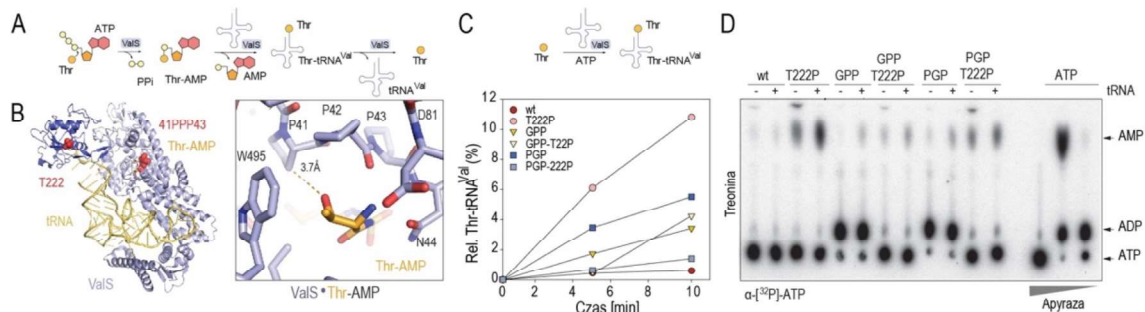


Aktywacja waliny (*reakcja 1*) była przeze mnie monitorowana przy wykorzystaniu radioaktywnie znakowanego γ [³²P]ATP i przy zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej (ang. TLC). W reakcji monitorowałam uwolnienie pirofosforanu γ [³²P]PPi przez dziki enzym ValS oraz przez mutant ValS-GPP. Uwolnienie pirofosforanu (PPi) obserwowałam pośrednio, z racji obecności pirofosfatazy w reakcji. Pirofosfataza konwertuje PPi do nieorganicznego monofosforanu (Pi), który jest monitorowany w czasie rozdziału na płytkach TLC. Powodem zastosowania pirofosfatazy jest fakt braku możliwości identyfikacji PPi w warunkach zastosowanych przeze mnie w rozdziale reakcji na płytkach TLC. Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowałam uwolnienie monofosforanu (Pi) w obecności pirofosfatazy zarówno przez dziki enzym ValS, jak i w mniejszym stopniu przez ValS-GPP. Dodatkowo, aktywność jest stymulowana obecnością tRNA^{Val} w reakcji⁶³ (*Rysunek 17F*). Zaskakująco, w reakcji z udziałem ValS-GPP obserwowałam również obecność produktu zawierającego γ [³²P]Pi, ale posiadającego inny czas retencji niż nieorganiczny monofosforan (*Rysunek 17F*). Podobny produkt uboczny obserwowałam w czasie aktywności mutantów ValS-PGP oraz ValS-PPG. Natomiast mutant ValS-GGG nie posiada żadnej wykrywalnej przeze mnie aktywności katalitycznej⁶³. Pirofosforany produkowane przez syntetazy aminoacylo-tRNA okazjonalnie mogą atakować ATP i ADP w procesie fosforolizy, czego konsekwencją jest powstanie polifosforanów diadenozynowych – takich jak Ap3A lub Ap4A⁷⁴. Związki te są jednak hydrolizowane przez fosfatazy – w naszym przypadku obecność pirofosfatazy w reakcji nie usuwa tego produktu ubocznego, a jego charakter pozostał nierozwiązany⁶³. Przeprowadziłam analogiczny eksperyment z wykorzystaniem α [³²P]ATP, który pokazał, że dziki enzym ValS oraz, w mniejszym stopniu, mutanty ValS-GPP, ValS-PGP i ValS-PPG uwalniają α [³²P]AMP po transferze waliny na tRNA^{Val} (*Rysunek 17G*)⁶³. Zaskakująco, dla wszystkich testowanych mutantów zaobserwowałam również, niezależne od obecności tRNA, uwalnianie α [³²P]ADP (*Rysunek 17G*). Te wyniki sugerują, że mutacje w konserwatywnym motywie prolinowym w centrum aktywnym syntetazy walylo-tRNA nie tylko redukują wydajność aminoacylacji tRNA ale również prowadzą do nieproduktywnej hydrolizy ATP do ADP⁶³.

Aby przetestować hipotezę, że Pro⁴¹ zapobiega wiązaniu izoleucyny do centrum aktywnego syntetazy walylo-tRNA wykorzystałam [¹⁴C]izoleucynę zamiast [¹⁴C]waliny w teście na aminoacetylację tRNA^{Val}. Mechanizm podwójnej selekcji aminokwasu przez syntetazy IleS i ValS – tzw. mechanizm podwójnego sita (ang. *Double sieve*) został opisany przez Fersht'a i Kaethner⁷⁵. W modelu tym, syntetaza ValS rozpoznaje kształt i aktywuje cząsteczką ATP L-treoninę i L-walinę „odsiewając” w ten sposób inne aminokwasy. Natomiast w drugim etapie, domena edytująca „odsiewa” treoninę ze względu na obecność

Autoreferat

grupy hydroksylowej (Rysunek 18A)⁷⁵. Mechanizm ten zapobiega błędnej aminoacylacji tRNA i w konsekwencji zmniejsza możliwość błędnego wstawienia aminokwasu w czasie syntezy łańcucha polipeptydowego.



Rysunek 18. Obecność prolin w centrum aktywnym syntetazy ValS zapobiega formacji Thr-tRNA^{Val}. (A) Schemat błędnej aktywacji i błędnej acetylacji tRNA^{Val} treoniny oraz aktywności edytującej syntetazy ValS. (B) Struktura syntetazy ValS ValS – pdb: 1GAX⁶⁹ – z tRNA i Thr-AMP. Reszty PPP oraz T222 zaznaczono kolorem czerwonym. (C) Błędna acetylacja tRNA^{Val} treoniny. (D) Autoradiogram płytki rozdzielu chromatograficznego reakcji aminoacylacji tRNA^{Val} treoniny z użyciem α-[³²P]ATP. Wzrastające stężenie apyrazy użyto w celu uzyskania AMP i ADP jako wzorca. Zmodyfikowane źródło⁶³

Nie zaobserwowałam błędnej aminoacylacji dla żadnego z testowanych wariantów enzymu ValS. Co więcej, dodatkowa mutacja T222P, która inaktywuje zdolność edytowania błędnej aminoacylacji również nie pozwoliła na formację Ile-tRNA^{Val} ⁶³, co jest zgodne z obserwacją, że walina nie jest substratem dla domeny edytującej syntetazy ValS⁷⁶. Isoleucyna nie była również substratem dla ValS-GPP⁶³, co sugeruje, że Pro41 nie jest jedyną resztą rozróżniającą walinę od isoleucyny. Z drugiej zaś strony, treonina – aminokwas izosteryczny z waliną – jest aktywowana przez syntetazę ValS, ale Tre-tRNA^{Val} ulega deacetylacji przez domenę edytującą syntetazy ValS⁷⁵. Wykorzystując [¹⁴C]treoninę w miejsce [¹⁴C]waliny, przetestowaliśmy aktywność syntetazy ValS w aktywowaniu treoniny. W moich testach, dziki enzym ValS wykazywał niską, ale wykrywalną błędną aminoacylację tRNA^{Val} treoniną⁶³, która wzrastała gdy aktywność domeny edytującej była inaktywowana mutacją T222P (Rysunek 18B, C)⁷⁷. Odnotowałam również błędną aminoacylację tRNA^{Val} treoniną dla mutantów syntetazy ValS-GPP oraz ValS-PGP (Rysunek 18C)⁶³. Co ciekawe, nie zauważyłam by dodatkowa mutacja T222P nie powodowała wzrostu błędnej aminoacylacji⁶³, co sugeruje, że substytucja P41 lub P42 na glicynę może inaktywować domenę edytującą i zaburzać komunikacji pomiędzy domeną aktywującą i edytującą syntetazy walylo-tRNA. Zgodnie z hipotezą, że obie domeny enzymu ValS mogą się komunikować zauważyliśmy, że podwójne mutanty ValS-GPP/T222P oraz ValS-PGP/T222P, w przeciwieństwie do pojedynczych mutantów ValS-GPP oraz ValS-PGP, nie wykazują nieproduktywnej hydrolizy ATP do ADP (Rysunek 18D)⁶³. Podsumowując, postulujemy, że motyw prolinowy w centrum aktywnym syntetazy ValS jest ważny nie tylko dla efektywnej aminoacylacji tRNA^{Val}, ale również dla komunikacji z domeną edytującą by zapewnić efektywną deacetylację Thr-tRNA^{Val} ⁶³. Co ciekawe, wyniki analizy translatomu metodami sekwencjonowania wysokoprzepustowego wykonane z wykorzystaniem szczepu bakterii z brakującym czynnikiem EF-P ujawniły nie tylko pauzę rybosomalną nie tylko na sekwencjach poliprolinowych, ale również na sekwencjach poliwalinowych, co potwierdza istotność roli czynnika EF-P w translacji mRNA *valS* oraz w konsekwencji tłumaczy zaburzoną homeostazę białek w komórce⁷⁸.

Autoreferat

Podsumowanie

Publikacja 1: Ude, S., Lassak, J., **Starosta, A. L.**, Kraxenberger, T., Wilson, D. N., and Jung, K. (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches.

Science 339, 82-85. (IF₂₀₁₃ = 31,477, punkty MNiSW₂₀₁₃ = 50, cytowane 172 razy)

W badaniach tych pokazałam, że motywy triprolinowe (PPP) w sekwencji białka powodują pauzę rybosomu. Wykazałam, że obecność czynnika EF-P w czasie biosyntezy białka stymuluje ekspresję tych motywów. Używając konstruktów opartych o natywne białka zidentyfikowane w Escherichia coli oraz chimery lucyferazy potwierdziłam rolę czynnika EF-P w biosyntezie białka in vitro. Pokazałam in vitro, że modyfikacja czynnika EF-P jest niezbędna dla aktywności stymulowania tworzenia wiązania peptydowego między prolinami.

Publikacja 2: Peil, L., **Starosta, A. L.**, Lassak, J., Atkinson, G. C., Virumae, K., Spitzer, M., Tenson, T., Jung, K., Remme, J., and Wilson, D. N. (2013) Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P.

PNAS 110, 15265-15270. (IF₂₀₁₃ = 9,809, MNiSW₂₀₁₃ = 45, cytowane 66 razy)

W badaniach in vitro, pokazałam wpływ aminokwasu poprzedzającego sekwencję diprolinową oraz aminokwasu następującego po motywie diprolinowym na efektywność biosyntezy białka. Udowodniłam zależność ekspresji tych motywów z aktywnością czynnika EF-P. Odkrycie to zwiększyło pulę sekwencji poliprolinowych, które mogą stanowić problem dla aparatu translacyjnego. Pokazałam, że nie tylko motyw PPP, ale również pewne kombinacje XPP lub PPX powoduje pauzę rybosomalną.

Publikacja 3: **Starosta, A. L.**, Lassak, J., Peil, L., Atkinson, G., Virumae, K., Tenson, T., Remme, J., Jung, K., and Wilson, D. N. (2014) Translational stalling at polyproline-stretches is modulated by the sequence context upstream of the stall site.

Nucleic Acids Research 42(16):10711-9. (IF₂₀₁₄ = 9,112, MNiSW₂₀₁₄ = 40, cytowane 38 razy)

W badaniach tych przedstawiłam wnikliwą analizę in vitro wpływu aminokwasu poprzedzającego motyw triprolinowy w sekwencji białkowej. Pokazałam, że nie każdy motyw triprolinowy powoduje pauzę rybosomu, a aminokwas na pozycji -1 w stosunku do motywu PPP może modulować efektywność pauzy.

Publikacja 4 : **Starosta, A. L.**, Lassak, J., Peil, L., Atkinson, G. C., Woolstenhulme, C. J., Virumäe, K., Buskirk, A., Tenson, T., Remme, J., Jung, K., and Wilson, D. N. (2014) A conserved proline triplet in Val-tRNA synthetase and the origin of elongation factor P.

Cell Reports Oct 23;9(2):476-83. (IF₂₀₁₄ = 7,407, MNiSW₂₀₁₄ = 35, cytowane 10 razy)

W tej publikacji zaprezentowałam hipotezę istnienia czynnika elongacyjnego EF-P. Pokazałam, że ekspresja syntetazy walylo-tRNA jest ściśle zależna od funkcji czynnika EF-P, a motyw triprolinowy w centrum aktywnym syntetazy walylo-tRNA jest niezbędny dla prawidłowego i efektywnego funkcjonowania enzymu.

Autoreferat

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1 Udział w projektach naukowych / granty naukowe

Skutecznie aplikowałam o indywidualne stypendia podoktorskie, oraz o granty na stworzenie własnej grupy badawczej. Obecnie, w ramach grantów, zatrudniam jednego młodego doktora na pozycji adiunkta, oraz dwóch doktorantów (na stypendiach).

Granty na stworzenie własnej grupy badawczej:

12/2017 EMBO Installation Grant – Europejska Organizacja Biologii Molekularnej (edycja 2017) – 50 000 €/rok (na okres 3 do 5 lat) – wnioskodawca / kierownik projektu / pomysłodawca projektu

07/2017 FIRST TEAM grant finansowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (edycja 03/2017) – 1 999 164,00 zł – wnioskodawca / kierownik projektu / pomysłodawca projektu

Indywidualne stypendia:

09/2018 Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wybitnych Młodych Naukowców

07/2018 Grant Młodych – Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie – „Analiza wpływu zmiennych warunków środowiskowych na fenotyp i częstotliwość sporulacji u bakterii *Bacillus subtilis*”

05/2016 Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship, Horyzont 2020, Komisja Europejska (EU projekt 705648 – MBD) – 2-letni grant dla młodego doktora – 180 000 € – wnioskodawca / wykonawca projektu / inicjator projektu

06/2012 AXA Research Fund – 2-letni grant dla młodego doktora – 120 000 € – wnioskodawca / wykonawca projektu (<https://www.axa-research.org/en/projects/agata-starosta>)

5.2 Wkład w naukę po doktoracie

A. Badania nad syntezą białek u sporulującej bakterii *Bacillus subtilis*.

Jako inicjator projektu, zaproponowałam nowatorskie spojrzenie na proces sporulacji w bakteriach, z punktu widzenia translacji białek. Celem badań była identyfikacja nowych czynników odpowiedzialnych za powstanie spor oraz poszukiwanie elementów stanowiących o regulacji translacji białek. Sporulujące bakterie są poważnym zagrożeniem przy hospitalizacji, ale również przy produkcji żywności. Powodują zatrucia oraz poważne choroby układu pokarmowego, potencjalnie śmiertelne. Co więcej, szczepy takie jak pałeczka wąglika były już wykorzystywane do ataków bioterrorystycznych. W moich badaniach, używałam szczepu *Bacillus subtilis*, który jest niegroźny dla człowieka, ale jednocześnie jest bliskim krewnym patogennej bakterii takich jak (i) pałeczka wąglika – używana w atakach bioterrorystycznych, (ii) laseczka woskowa – odpowiedzialna za zatrucia pokarmowe, czy też (iii) *Clostridium difficile* – powodująca rzekomo-błoniaste zapalenie jelit, ostrą chorobę układu pokarmowego, która może prowadzić do śmierci. Wiele procesów komórkowych niezbędnych do powstania spor jest niezwykle podobnych pomiędzy tymi bakteriami, co czyni *B. subtilis* doskonałym obiektem badawczym.

Autoreferat

W czasie pracy w laboratorium w Newcastle zoptymalizowałam metodę sekwencjonowania wysokoprzepustowego aktywnie dekodowanych mRNA (tzw. „*ribosome profiling*”), co pozwala na monitorowanie z dokładnością do jednego nukleotydu dokładnej pozycji rybosomu na mRNA⁷⁹. Rybosom jako serce procesu syntezy białek potencjalnie może decydować o tym, które białka pojawią się w komórce. Metoda ta pozwala na mapowanie całego translatomu, co umożliwia analizę ilościową białek w komórce, ale również na identyfikację nowych genów, obliczenie szybkości translacji czy też identyfikację procesów regulacji ekspresji genów zależnych od rybosomu, na przykład tak zwany „stalling”, czyli pauzowanie rybosomu na specyficznych sekwencjach mRNA (zależnych od sekwencji aminokwasowej w rosnącym łańcuchu polipeptydowym).

2. Wyniki badań nad *Bacillusem* były podstawą do aplikacji o finansowanie na prowadzenie badań we własnej grupie na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, w ramach programu FIRST TEAM oraz EMBO Installation Grant.

Obecnie, moja grupa badawcza zajmuje się pracą mającą na celu identyfikację tak zwanych wyspecjalizowanych rybosomów. Do tej pory uważano, że wszystkie rybosomy w komórce są identyczne. Jednak ostatnie lata, przede wszystkim za sprawą coraz większej dostępności do wysokoprzepustowego sekwencjonowania genomów, ukazały ogrom wcześniej niezidentyfikowanych enzymów modyfikujących nukleotydy rybosomalnych RNA, tRNA oraz paralogi białek rybosomalnych. Dzięki tym odkryciom pojawiły się sugestie, że niewielka frakcja rybosomów może nosić inny wzór modyfikacji rRNA i/lub inny skład białek rybosomalnych, co dałoby jej przewagę w tłumaczeniu informacji genetycznej zakodowanej w wyselekcjonowanej grupie mRNA. Używając bakterii *Bacillus subtilis*, poszukujemy czynników determinujących specjalizację rybosomów w procesie tworzenia spor.

B. Praca nad mechanizmem działania antybiotyku z grupy hygromycyn A.

Używając szeregu metod, badaliśmy mechanizm inhibicji syntezy białek w bakterii przez antybiotyk hygromycynę A. Jest to praca łącząca biologię strukturalną (krystalografia rentgenowska), biofizykę (FRET) oraz biochemię w celu ustalenia molekularnych podstaw działania hygromycyny A⁸⁰.

W erze wzrastającej oporności na antybiotyki, potrzeba poszukiwań nowych inhibitorów wzrostu bakterii jest większa niż kiedykolwiek w historii antybiotykoterapii. We współpracy z laboratorium Profesora Kevina Reynoldsa badaliśmy zapomniany antybiotyk – hygromycynę A (HA). W badaniach został scharakteryzowany szlak biosyntezy HA⁷⁹. Dodatkowo, odkryto kinazę inaktywującą HA⁸¹, co potwierdzono badaniami *in vivo* i *in vitro*. We współpracy z laureatem nagrody Nobla – Profesorem Thomasem Steitzem oraz z Profesorem Scottem Blanchardem, wykorzystaliśmy metody analiz biochemicznych, biofizycznych oraz strukturalnych w celu zrozumienia mechanizmu działania HA na inhibicję biosyntezy białka⁸⁰. Odkryliśmy unikalną formę pośrednią tRNA w miejscu A rybosomu bakteryjnego oraz scharakteryzowaliśmy molekularny mechanizm działania HA oraz zaprezentowaliśmy detale tego procesu na poziomie rozdzielczości atomowej⁸⁰.

Polikanov, Y.S.*, Starosta, A.L.*, Juetter, M.F.*, Altman, R.B., Terry, D.S., Lu, W., Burnett, B.J., Dinos, G., Reynolds, K.A., Blanchard, S.C., Steitz, T.A., Wilson, D.N. (2015) Distinct tRNA Accommodation Intermediates Observed on the Ribosome with the Antibiotics Hygromycin A and A201A. *Molecular cell* 2015, 58(5):832-44.

C. Praca nad mechanizmem działania antybiotyku z grupy tetracyklin.

Autoreferat

Poszukiwanie nowych klas antybiotyków jest niezwykle atrakcyjnym zagadnieniem, jednakże wymagającym czasu oraz dużych nakładów finansowych, a mimo tego, osiągnięcie celu jest trudne. Co więcej, wiele antybiotyków działa na podobne, a czasem nawet identyczne miejsca inhibicji do znanych już klas, co w konsekwencji oznacza niską skuteczność inhibicji przeciwko mechanizmom oporności znanym naturze, co dodatkowo komplikuje proces poszukiwań nowych inhibitorów wzrostu mikroorganizmów. Z tego względu dużą popularnością cieszy się "racjonalne projektowanie" semi-syntetycznych pochodnych znanych antybiotyków w taki sposób, by miały potencjał przeciwko mechanizmom oporności na lek, na podstawie którego są projektowane. W czasie pracy w laboratorium D. Wilsona, opracowałam protokół na szybką i wysokoprzepustową analizę wielu nowych pochodnych antybiotyków, również w układzie z aktywnym mechanizmem oporności.

Badania we współpracy z firmą **Tetraphase Pharmaceuticals** nad tetracyklinami, popularnymi antybiotykami wiążącymi się do małej podjednostki rybosomalnej oraz blokującymi akomodację tRNA do miejsca A, pozwoliła na identyfikację nowej pochodnej tetracykliny z grupy glicylcyklin – erawacykliny (TP-434) – która wykazuje dużo silniejszą inhibicję biosyntezy białka niż popularna tetracyklina lub też doksycyklina, ale również nie jest podatna na oporność wywołaną obecnością czynnika TetM, który ma zdolność aktywnego usuwania cząsteczki antybiotyku z jej miejsca wiązania na rybosomie⁸². Eravacyklina jest obecnie testowana w ostatniej fazie testów klinicznych. Co więcej, we współpracy z grupą Profesora Marat'a Yusupov'a, udało nam się uzyskać strukturę krystaliczną tetracykliny oraz tygecykliny – pierwszej glicylcykliny używanej klinicznie⁸³. Przedstawiliśmy również wyniki testów oporności na czynnik TetM oraz dane dla tetracyklin z grupy pentacyklin, omadacyklin, fluorocyklin oraz glicylcyklin. Badania takie pozwalają na racjonalne projektowanie nowych pochodnych leków z tej grupy.

Grossman, T. H., **Starosta, A. L.**, Fyfe, C., O'Brien, W., Rothstein, D. M., Mikołajka, A., Wilson, D. N., and Sutcliffe, J. A. (2012) Target- and resistance-based mechanistic studies with TP-434, a novel fluorocycline antibiotic. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 56, 2559-2564.

Jenner, L.*, **Starosta, A. L.***, Terry, D. S., Mikołajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S. C., Wilson, D. N., and Yusupova, G. (2013) Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. **PNAS** 110, 3812-3816.

D. Praca nad funkcją czynnika elongacyjnego EF-P w bakterii *Escherichia coli*.

W laboratorium Profesora D. Wilsona, prowadziłam badania nad funkcją elongacyjnego czynnika EF-P na biosyntezę białek. W tym czasie odkryliśmy, że EF-P jest post-translacyjnie modyfikowane przez hydrokylowaną beta-lizynę^{84,85}. Dalsze badania pozwoliły na odkrycie funkcji EF-P w procesie translacji. Pokazaliśmy, że modyfikowane EF-P umożliwia translację poli-prolin²⁶. Gdy w sekwencji aminokwasowej występują więcej niż dwie proliny (PPP), jedna za drugą, synteza białka zwalnia lub czasem niemal całkowicie ustaje. EF-P zapobiega pauzom rybosomu i pozwala na nieprzerwaną syntezę sekwencji z poli-prolinami. W dalszych badaniach pokazaliśmy, że już nawet dwie proliny są wystarczające do spowolnienia translacji, jeśli występują w pewnych układach sekwencji aminokwasowych³⁹. Dodatkowo pokazaliśmy, że jest to spowodowane daleką od optymalnej pozycją prolin w centrum katalitycznym rybosomu⁵⁵. Dokładniejszy opis projektu w rozdziale 5.2.

Autoreferat

6. Bibliografia

1. Schmeing TM, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 2009;461(7268):1234-1242. doi:10.1038/nature08403
2. Karimi R, Pavlov MY, Buckingham RH, Ehrenberg M. Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell*. 1999;3(5):601-609. doi:10.1016/S1097-2765(00)80353-6
3. Scolnick E, Tompkins R, Caskey T, Nirenberg M. Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;61(2):768-774. doi:10.1073/PNAS.61.2.768
4. Jin H, Kelley AC, Loakes D, Ramakrishnan V. Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(19):8593-8598. doi:10.1073/pnas.1003995107
5. Jin H, Kelley AC, Ramakrishnan V. Crystal structure of the hybrid state of ribosome in complex with the guanosine triphosphatase release factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):15798-15803. doi:10.1073/pnas.1112185108
6. Gao H, Zhou Z, Rawat U, et al. RF3 Induces Ribosomal Conformational Changes Responsible for Dissociation of Class I Release Factors. *Cell*. 2007;129(5):929-941. doi:10.1016/J.CELL.2007.03.050
7. Freistroffer D V, Pavlov MY, MacDougall J, Buckingham RH, Ehrenberg M. Release factor RF3 in E.coli accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *EMBO J*. 1997;16(13):4126-4133. doi:10.1093/emboj/16.13.4126
8. Wilson DN. The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009;44(6):393-433. doi:10.3109/10409230903307311
9. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):35-48. doi:10.1038/nrmicro3155
10. Arenz S, Wilson DN. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(9):a025361. doi:10.1101/cshperspect.a025361
11. Starosta AL, Lassak J, Jung K, Wilson DN. The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(6):1172-1201. doi:10.1111/1574-6976.12083
12. Glick BR, Ganoza MC. Identification of a Soluble Protein that Stimulates Peptide Bond Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:4257-4260. doi:10.2307/64934
13. Glick BR, Chládek S, Ganoza MC. Peptide bond formation stimulated by protein synthesis factor EF-P depends on the aminoacyl moiety of the acceptor. *Eur J Biochem*. 1979;97(1):23-28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/383483>. Accessed June 10, 2018.
14. Ganoza MC, Aoki H. Peptide Bond Synthesis: Function of the efp Gene Product. *Biol Chem*. 2000;381(7):553-559. doi:10.1515/BC.2000.071
15. Green RH, Glick BR, Ganoza MC. Requirements for in vitro reconstruction of protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;126(2):792-798. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3884000>. Accessed June 10, 2018.
16. An G, Glick BR, Friesen JD, Ganoza MC. Identification and quantitation of elongation factor EF-P in Escherichia coli cell-free extracts. *Can J Biochem*. 1980;58(11):1312-1314. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7011506>. Accessed June 10, 2018.
17. Aoki H, Xu J, Emili A, Chosay JG, Golshani A, Ganoza MC. Interactions of elongation factor EF-P with the Escherichia coli ribosome. *FEBS J*. 2008;275(4):671-681. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06228.x
18. Kristensen O, Laurberg M. Expression, refolding and crystallization of Aquifex

Autoreferat

- aeolicus elongation factor P. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002;58(Pt 6 Pt 2):1039-1041. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037310>. Accessed June 10, 2018.
19. Hanawa-Suetsugu K, Sekine S-i, Sakai H, et al. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(26):9595-9600. doi:10.1073/pnas.0308667101
 20. Yanagisawa T, Sumida T, Ishii R, Takemoto C, Yokoyama S. A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(99):1136-1143. doi:10.1038/nsmb.1889
 21. Choi S, Choe J. Crystal structure of elongation factor P from *Pseudomonas aeruginosa* at 1.75 Å resolution. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2011;79(5):1688-1693. doi:10.1002/prot.22992
 22. Blaha G, Stanley RE, Steitz TA. Formation of the First Peptide Bond: The Structure of EF-P Bound to the 70S Ribosome. *Science (80-)*. 2009;325(5943):966-970. doi:10.1126/science.1175800
 23. Huter P, Arenz S, Bock L V., et al. Structural Basis for Polyproline-Mediated Ribosome Stalling and Rescue by the Translation Elongation Factor EF-P. *Mol Cell*. 2017;68(3):515-527.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.10.014
 24. Bailly M, de Crécy-Lagard V. Predicting the pathway involved in post-translational modification of Elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biol Direct*. 2010;5(1):3. doi:10.1186/1745-6150-5-3
 25. Navarre WW, Zou SB, Roy H, et al. PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell*. 2010;39(2):209-221. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.021
 26. Peil L, Starosta AL, Virumäe K, et al. Lys34 of translation elongation factor EF-P is hydroxylated by YfcM. *Nat Chem Biol*. 2012;8(8):695-697. doi:10.1038/nchembio.1001
 27. Starosta AL, Wilson DN. Ribosome Stalling at Diprolyl Motifs Is Alleviated by Elongation Factor P. In: *Regulatory Nascent Polypeptides*. Tokyo: Springer Japan; 2014:99-116. doi:10.1007/978-4-431-55052-5_6
 28. Behshad E, Ruzicka FJ, Mansoorabadi SO, Chen D, Reed GH, Frey PA. Enantiomeric Free Radicals and Enzymatic Control of Stereochemistry in a Radical Mechanism: The Case of Lysine 2,3-Aminomutases †. *Biochemistry*. 2006;45(42):12639-12646. doi:10.1021/bi061328t
 29. Park J-H, Johansson HE, Aoki H, et al. Post-translational modification by β-lysylation is required for activity of *Escherichia coli* elongation factor P (EF-P). *J Biol Chem*. 2012;287(4):2579-2590. doi:10.1074/jbc.M111.309633
 30. Roy H, Zou SB, Bullwinkle TJ, et al. The tRNA synthetase paralog PoxA modifies elongation factor-P with (R)-β-lysine. *Nat Chem Biol*. 2011;7(10):667-669. doi:10.1038/nchembio.632
 31. Rodnina M V., Beringer M, Wintermeyer W. Mechanism of peptide bond formation on the ribosome. *Q Rev Biophys*. 2006;39(03):203. doi:10.1017/S003358350600429X
 32. Schmeing TM, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 2009;461(7268):1234-1242. doi:10.1038/nature08403
 33. Pavlov MY, Watts RE, Tan Z, Cornish VW, Ehrenberg M, Forster AC. Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(1):50-54. doi:10.1073/pnas.0809211106
 34. Johansson M, Jeong K-W, Trobro S, et al. pH-sensitivity of the ribosomal peptidyl transfer reaction dependent on the identity of the A-site aminoacyl-tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(1):79-84. doi:10.1073/pnas.1012612107

Autoreferat

35. Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, Rodnina M V. EF-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues. *Science* (80-). 2013;339(6115):85-88. doi:10.1126/science.1229017
36. Mao JC-H. Substrate specificity of Escherichiacoli peptidyltransferase at the donor site. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973;52(2):595-600. doi:10.1016/0006-291X(73)90754-7
37. Muto H, Ito K. Peptidyl-prolyl-tRNA at the ribosomal P-site reacts poorly with puromycin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(4):1043-1047. doi:10.1016/J.BBRC.2007.12.072
38. Wohlgemuth I, Brenner S, Beringer M, Rodnina M V. Modulation of the Rate of Peptidyl Transfer on the Ribosome by the Nature of Substrates. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32229-32235. doi:10.1074/jbc.M805316200
39. Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, Jung K. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* (80-). 2013;339(6115):82-85. doi:10.1126/science.1228985
40. Iannino F, Ugalde JE, Iñón de Iannino N. Brucella abortus efp gene is required for an efficient internalization in HeLa cells. *Microb Pathog*. 2012;52(1):31-40. doi:10.1016/J.MICPATH.2011.09.008
41. Zou SB, Hersch SJ, Roy H, et al. Loss of elongation factor P disrupts bacterial outer membrane integrity. *J Bacteriol*. 2012;194(2):413-425. doi:10.1128/JB.05864-11
42. de Crécy E, Metzgar D, Allen C, et al. Development of a novel continuous culture device for experimental evolution of bacterial populations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;77(2):489-496. doi:10.1007/s00253-007-1168-5
43. OHASHI Y, INAOKA T, KASAI K, et al. Expression Profiling of Translation-associated Genes in Sporulating *Bacillus subtilis* and Consequence of Sporulation by Gene Inactivation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67(10):2245-2253. doi:10.1271/bbb.67.2245
44. Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, Fukui K. Genome-Wide Screening of Genes Required for Swarming Motility in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*. 2007;189(3):950-957. doi:10.1128/JB.01294-06
45. Kearns DB, Chu F, Rudner R, Losick R. Genes governing swarming in Bacillus subtilis and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol Microbiol*. 2004;52(2):357-369. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.03996.x
46. Bearson SMD, Bearson BL, Rasmussen MA. Identification of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Genes Important for Survival in the Swine Gastric Environment. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(4):2829-2836. doi:10.1128/AEM.72.4.2829-2836.2006
47. Bearson SMD, Bearson BL, Brunelle BW, Sharma VK, Lee IS. A Mutation in the *poxA* Gene of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Alters Protein Production, Elevates Susceptibility to Environmental Challenges, and Decreases Swine Colonization. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(6):725-732. doi:10.1089/fpd.2010.0796
48. Kaniga K, Compton MS, Curtiss R, Sundaram P. Molecular and functional characterization of Salmonella enterica serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun*. 1998;66(12):5599-5606.
49. Merrell DS, Hava DL, Camilli A. Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of Vibrio cholerae. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1471-1491. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02857.x
50. Peng WT, Banta LM, Charles TC, Nester EW. The *chvH* locus of Agrobacterium encodes a homologue of an elongation factor involved in protein synthesis. *J Bacteriol*. 2001;183(1):36-45. doi:10.1128/JB.183.1.36-45.2001
51. Woolstenhulme CJ, Parajuli S, Healey DW, et al. Nascent peptides that block protein

Autoreferat

- synthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(10):E878-E887.
 doi:10.1073/pnas.1219536110
52. Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes. *Cell.* 2011;147(4):789-802. doi:10.1016/j.cell.2011.10.002
53. Li G-W, Oh E, Weissman JS. The anti-Shine–Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature.* 2012;484(7395):538-541. doi:10.1038/nature10965
54. Peil L, Starosta AL, Lassak J, et al. Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(38):15265-15270. doi:10.1073/pnas.1310642110
55. Starosta AL, Lassak J, Peil L, et al. Translational stalling at polyproline stretches is modulated by the sequence context upstream of the stall site. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(16):10711-10719. doi:10.1093/nar/gku768
56. Kozak M. Primer extension analysis of eukaryotic ribosome-mRNA complexes. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(21):4853-4859.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9776744>. Accessed July 23, 2018.
57. Hartz D, McPheeters DS, Traut R, Gold L. [27] Extension inhibition analysis of translation initiation complexes. *Methods Enzymol.* 1988;164:419-425. doi:10.1016/S0076-6879(88)64058-4
58. Pal D, Chakrabarti P. Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *J Mol Biol.* 1999;294(1):271-288. doi:10.1006/JMBI.1999.3217
59. Zondlo NJ. Aromatic–Proline Interactions: Electronically Tunable CH/π Interactions. *Acc Chem Res.* 2013;46(4):1039-1049. doi:10.1021/ar300087y
60. Wu W-J, Raleigh DP. Local control of peptide conformation: Stabilization of cis proline peptide bonds by aromatic proline interactions. *Biopolymers.* 1998;45(5):381-394. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(19980415)45:5<381::AID-BIP6>3.0.CO;2-H
61. Reimer U, Scherer G, Drewello M, Kruber S, Schutkowski M, Fischer G. Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *J Mol Biol.* 1998;279(2):449-460. doi:10.1006/JMBI.1998.1770
62. Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kubyshkin V, et al. Entropic contribution of elongation factor P to proline positioning at the catalytic center of the ribosome. *J Am Chem Soc.* 2015;137(40):12997-13006. doi:10.1021/jacs.5b07427
63. Starosta AL, Lassak J, Peil L, et al. A Conserved Proline Triplet in Val-tRNA Synthetase and the Origin of Elongation Factor P. *Cell Rep.* 2014;9(2):476-483. doi:10.1016/J.CELREP.2014.09.008
64. Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, et al. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol.* 2007;25(11):1281-1289. doi:10.1038/nbt1354
65. Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, et al. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol.* 2003;185(19):5673-5684. doi:10.1128/JB.185.19.5673-5684.2003
66. Arnez JG, Moras D. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(6):211-216. doi:10.1016/S0968-0004(97)01052-9
67. Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2006;2(1):2006.0008. doi:10.1038/msb4100050
68. Yanofsky C. Operon-specific control by transcription attenuation. *Trends Genet.* 1987;3:356-360. doi:10.1016/0168-9525(87)90297-6

Autoreferat

69. Fukai S, Nureki O, Sekine S, et al. Structural Basis for Double-Sieve Discrimination of L-Valine from L-Isoleucine and L-Threonine by the Complex of tRNA^{Val} and Valyl-tRNA Synthetase. *Cell*. 2000;103(5):793-803. doi:10.1016/S0092-8674(00)00182-3
70. Nakama T, Nureki O, Yokoyama S. Structural Basis for the Recognition of Isoleucyl-Adenylate and an Antibiotic, Mupirocin, by Isoleucyl-tRNA Synthetase. *J Biol Chem*. 2001;276(50):47387-47393. doi:10.1074/jbc.M109089200
71. Fukai S, Nureki O, Sekine S-I, Shimada A, Vassilyev DG, Yokoyama S. Mechanism of molecular interactions for tRNA(Val) recognition by valyl-tRNA synthetase. *RNA*. 2003;9(1):100-111. doi:10.1261/RNA.2760703
72. Nureki O, Vassilyev DG, Tateno M, et al. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science*. 1998;280(5363):578-582. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554847>. Accessed August 25, 2018.
73. Silvian LF, Wang J, Steitz TA. Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and mupirocin. *Science*. 1999;285(5430):1074-1077. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446055>. Accessed August 25, 2018.
74. Plateau, Pierre and Blanquet S. Chapter 4. Synthesis of NpnN' (n = 3 or 4) in vitro and in vivo. In: *Ap4a and Other Dinucleoside Polyphosphates by A.G. McLennan; Ed. (Boca Raton: CRC Press).*; 1976:81-107.
75. Fersht AR, Kaethner MM. Enzyme hyperspecificity. Rejection of threonine by the valyl-tRNA synthetase by misacylation and hydrolytic editing. *Biochemistry*. 1976;15(15):3342-3346. doi:10.1021/bi00660a026
76. Tardif KD, Liu M, Vitseva O, Hou YM, Horowitz J. Misacylation and editing by Escherichia coli valyl-tRNA synthetase: evidence for two tRNA binding sites. *Biochemistry*. 2001;40(27):8118-8125. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434781>. Accessed August 25, 2018.
77. Doring V, Mootz HD, Nangle LA, et al. Enlarging the Amino Acid Set of Escherichia coli by Infiltration of the Valine Coding Pathway. *Science (80-)*. 2001;292(5516):501-504. doi:10.1126/science.1057718
78. Woolstenhulme CJ, Guydosh NR, Green R, Buskirk AR. High-Precision Analysis of Translational Pausing by Ribosome Profiling in Bacteria Lacking EFP. *Cell Rep*. 2015;11(1):13-21. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.014
79. Palaniappan N, Dhote V, Ayers S, Starosta AL, Wilson DN, Reynolds KA. Biosynthesis of the Aminocyclitol Subunit of Hygromycin A in Streptomyces hygrosopicus NRRL 2388. *Chem Biol*. 2009;16(11):1180-1189. doi:10.1016/j.chembiol.2009.10.013
80. Polikanov YS, Starosta AL, Juette MF, et al. Distinct tRNA Accommodation Intermediates Observed on the Ribosome with the Antibiotics Hygromycin A and A201A. *Mol Cell*. 2015;58(5):832-844. doi:10.1016/j.molcel.2015.04.014
81. Dhote V, Starosta AL, Wilson DN, Reynolds KA. The final step of hygromycin A biosynthesis, oxidation of C-5"-dihydrohygromycin A, is linked to a putative proton gradient-dependent efflux. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5163-5172. doi:10.1128/AAC.01069-09
82. Grossman TH, Starosta AL, Fyfe C, et al. Target- and resistance-based mechanistic studies with TP-434, a novel fluorocycline antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2559-2564. doi:10.1128/AAC.06187-11
83. Jenner L, Starosta AL, Terry DS, et al. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(10):3812-3816. doi:10.1073/pnas.1216691110
84. Ingolia NT, Ghaemmaghani S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (80-)*. 2009;324(5924):218-223. doi:10.1126/science.1168978
85. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling

Autoreferat

strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc.* 2012;7(8):1534-1550.
doi:10.1038/nprot.2012.086

Agata Starosta