Provjera kontrole kvalitete reakcije aminoaciliranja

Stojan, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:629663

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Provjera kontrole kvalitete reakcije aminoaciliranja

Quality control in the reaction of aminoacylation

SEMINARSKI RAD

Iva Stojan

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2017.

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) 2

2.1. Aminoaciliranje: sintetska reakcija 3

2.2. Razredi aminoacil-tRNA-sintetaza 5

3. Mehanizmi popravka pogreške 6

4. Neproteinogene aminokiseline kao prijetnja točnosti translacije 9

4.1. Neproteinogena aminokiselina meta-tirozin (m-Tyr) 10

4.2. Neproteinogena aminokiselina norvalin (Nva) 11

5. Eliminacija neproteinogenih aminokiselina iz genetičkog koda 12

6. Literatura 17

7. Sažetak 21

8. Summary 22

1. Uvod

Prema centralnoj dogmi molekularne biologije, genetička informacija pohranjena u molekuli DNA se prepisuje u glasničku molekulu RNA (mRNA) koja se potom prevodi u proteine. Translacija, jedan od ključnih biokemijskih procesa koji se zbiva u svim živim stanicama, proces je biosinteze polipeptida. Podrazumijeva prevođenje niza nukleotidnih tripleta mRNA u niz aminokiselina koje tvore proteine i dio je procesa ekspresije gena. Translacija se zbiva izvan jezgre u citoplazmi stanica na moćnim tvornicama proteina – ribosomima, ribonukleoproteinskim česticama sastavljenim od male i velike podjedinice. Kod prokariota događa se sprezanje procesa transkripcije i translacije, dok su kod eukariota ta dva procesa prostorno i vremenski odvojena. Proces translacije sastoji se od tri koraka: inicijacije, elongacije i terminacije. Inicijacija podrazumijeva vezanje inicijacijske molekule aminoacil-tRNA (aa-tRNA) na startni signal, inicijacijski kodon AUG u molekuli mRNA. Molekule transfer–RNA (tRNA) su male adaptorske molekule u biosintezi proteina duge 73-93 nukleotida, koje posjeduju mjesto za vezanje specifične aminokiseline i antikodon, triplet baza koji specifično prepoznaje kodonski triplet molekule mRNA. Molekule tRNA prenose aminokiseline do ribosoma. Antikodon na tRNA je komplementaran kodonu na mRNA što omogućava pepoznavanje adaptora i mRNA te sam proces translacije. Poslije inicijacije slijedi korak elongacije koji podrazumijeva vezanje elongacijskih molekula aa-tRNA na ribosom, stvaranje peptidnih veza, translokaciju i produživanje nastajućeg polipeptidnog lanca od N-kraja prema C-kraju. Terminacija je poslijednji korak translacije gdje određeni faktori otpuštanja prepoznaju terminacijski stop kodon, a esterska veza između tRNA i nastalog polipeptida se hidrolizira. Polipeptid potom disocira sa ribosoma i nastavlja svoj biokemijski put. Preciznost translacije je od velike važnosti za životni ciklus stanica. Ovaj proces fino je reguliran u svom samom početku u dva ključna koraka: u stvaranju točno sintetiziranih molekula aa-tRNA pomoću enzima aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) te u ribosomskoj selekciji aa-tRNA prilikom čitanja kodona na molekuli mRNA (Ling i sur. 2009). Ukupna stopa pogreške procesa translacije iznosi otprilike 10^{-4} (Loftfield i sur. 1972). AaRS omogućuju vjernu sintezu aminoaciliranih tRNA visokom selektivnošću prema supstratima te „proofreading-om“–hidrolitičkom razgradnjom nepripadnih produkata. Mehanizmima popravka vlastite pogreške, aaRS osiguravaju visoku točnost reakcije aminoaciliranja i doprinose vjernosti cijelog procesa translacije. AaRS trebaju prepoznati pripadnu aminokiselinu, pripadnu tRNA čiji je antikodon komplementaran kodonu koji kodira

određenu aminokiselinu, katalizirati reakciju aminoaciliranja odnosno nastajanja esterske veze između aminokiseline i molekule tRNA te ispraviti nepravilno sintetizirane molekule aa-tRNA. Čak 10 od 24 različitih aaRS obitelji nemaju mogućnost razlikovanja pripadnih od nepripadnih aminokiselina u sintetskom mjestu s dovoljnim stupnjem točnosti, stoga posjeduju dodatne mehanizme za hidrolitičko uređivanje pogrešno aminoaciliranih tRNA (Perona i Gruić–Sovulj, 2013). Mehanizmi provjere kontrole kvalitete reakcije aminoaciliranja su raznoliki i kompleksni, neophodni za ispravno odvijanje procesa translacije visoke vjernosti koja je osnova za postojanje i razvitak života. AaRS predstavljaju idealne mete za otkriće novih antibiotika, jer unatoč rasprostranjenosti u svim staničnim organizmima, značajno se razlikuju u prokariota i eukariota, omogućavajući antibiotsku selektivnu inhibiciju enzima (Hurdle i sur. 2005). Razvijaju se novi antibiotici kojima su mete aktivna sintetska mjesta bakterijskih sintetaza, primjerice fenilalanil-tRNA-sintetaze (PheRS), a pritom ne utječu na eukariotske sintetaze. Također se istražuju antifugalni lijekovi kojima je meta leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS). Defektni popravci pogrešno aminoaciliranih tRNA, posljedice mutacija u genima za aaRS u sisavaca, uzrokuju sklonost nastanku određenih bolesti: neurodegeneraciji, encefalomiopatiji, aterosklerozi. Primjerice, u ljudi je bolest encefalomiopatija povezana s mutacijama u genu za mitohondrijsku treonil-tRNA-sintetazu (ThrRS), koja nema funkcionalan popravak pogreške (Wang i sur. 2016). Također se pretpostavlja da bi ateroskleroza mogla biti povezana s nefunkcionalnošću metionil-tRNA-sintetaze (MetRS) koja pogrešno veže homocistein. Produkt ove reakcije je toksičan i visoke koncentracije homocisteina su povezane s nastankom ove bolesti (Jakubowski, 2001). Bolje razumijevanje mehanizama popravka pogreški koje provode aaRS može osigurati i bolje razumijevanje mehanizama određenih bolesti te osigurati njihove bolje tretmane.

2. Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS)

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi, prevoditelji genetičkog koda, koji vrše ključan proces kovalentnog povezivanja aminokiselina s pripadnom molekulom tRNA, odnosno s onom tRNA čiji je antikodon komplementaran kodonu na mRNA koji kodira dotičnu aminokiselinu. Bez ovih moćnih katalizatora sam proces translacije ne bi mogao ni započeti. AaRS sudjeluju u dešifriranju genetičkog koda katalizirajući stvaranje esterske veze između pripadne aminokiseline i pripadne tRNA. AaRS prepoznaju pripadnu tRNA najviše na osnovi

strukture antikodonske i akceptorske peteljke, koje su specifične za svaku molekulu tRNA. Također, svaka molekula tRNA posjeduje specifične determinante duž molekule, često u varijabilnoj ruci, koje predstavljaju elemente identiteta za prepoznavanje od strane pripadne sintetaze (Yadavalli i Ibba, 2012). U principu, za svaku aminokiselinu postoji specifična aaRS koja ju prepoznaje, dakle postoji 20 različitih aminoacil-tRNA-sintetaza. Tijekom procesa translacije, nakon stvaranja ispravno sintetizirane aa-tRNA, ona se prenosi elongacijskim faktorom (EF–Tu kod prokariota) do ribosoma gdje dalje omogućuje prevođenje slijeda nukleotida u molekuli mRNA u slijed aminokiselina rastućeg polipeptidnog lanca (Ibba, 1999).

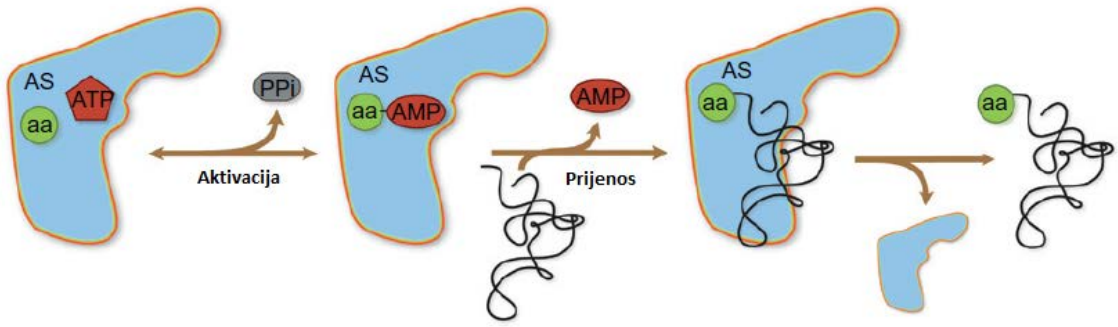
2.1 Aminoaciliranje: sintetska reakcija

Aminoaciliranje je sintetska reakcija koju provode aaRS u dva koraka. U prvom, aktivacijskom koraku gdje se koristi molekula adenozin-trifosfata (ATP-a) za aktivaciju aminokiseline, nastaje aaRS:aminoacil-adenilatni kompleks uz oslobađanje anorganskog pirofosfata (Slika 1). α-karboksilatni kisik aminokiseline napada α-fosfor ATP-a pri čemu nastaje miješani anhindrid-aminoacil-adenilat (aa-AMP) (Perona i Gruić–Sovulj, 2014). Međuprodukt aminoacil-AMP ne disocira s enzima između dva koraka reakcije. U drugom koraku 2' ili 3' hidroksilna skupina terminalnog adenozina (A76), koji se nalazi na 3'-kraju akceptorske peteljke molekule tRNA, nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata pri čemu nastaje esterska veza u molekuli aa-tRNA uz oslobađanje AMP-a (Ibba i Söll, 2000). Hidroliza pirofosfatnog produkta enzimom anorganskom pirofosfatazom osigurava termodinamsku povoljnost reakcije, dakle stvaranju esterske veze u molekuli aa-tRNA doprinosi cijepanje dvije visokoenergetske fosfoanhidridne veze (Perona i Gruić–Sovulj, 2013). AaRS se svrstavaju u dva različita razreda prema različitoj strukturi katalitičke domene i očuvanim sljedovima aminokiselina, a koja hidroksilna skupina A76 će biti nukleofil jest još jedno svojstvo prema kojem se razlikuju.

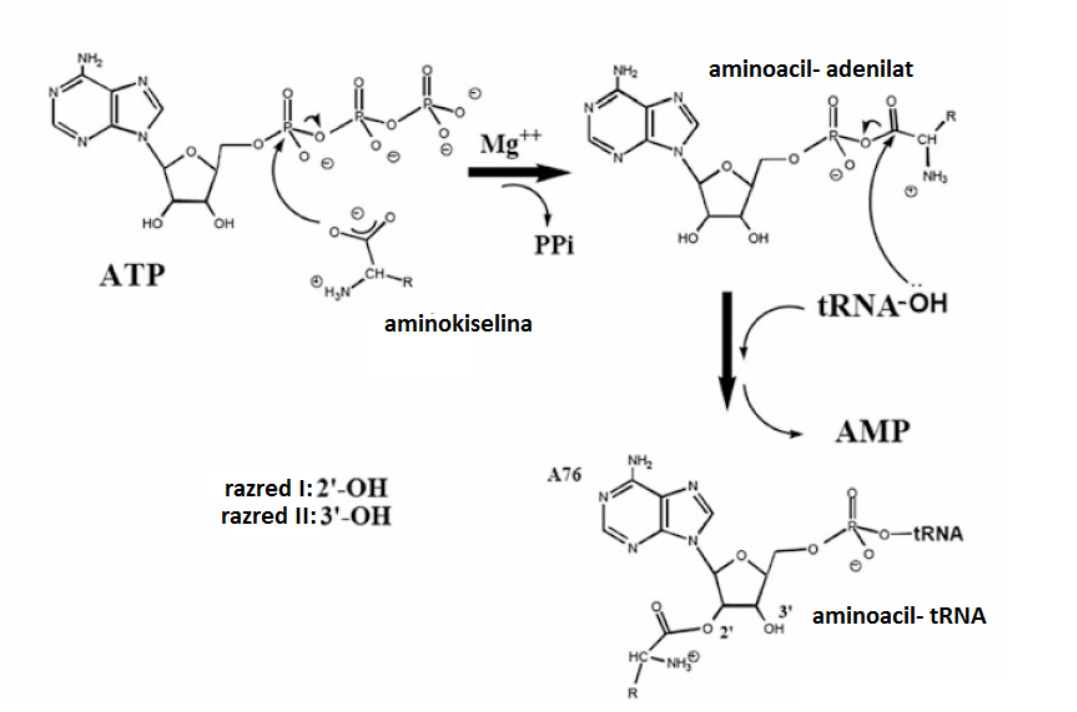
Reakcija aminoaciliranja se može sažeti sljedećim prikazom (Slika 2.):

1) aminokiselina + ATP → aminoacil-AMP + PPi
2) aminoacil-AMP + tRNA → aminoacil-tRNA + AMP

Ukupno: aminokiselina + ATP + tRNA → aminoacil-tRNA + AMP + PPi



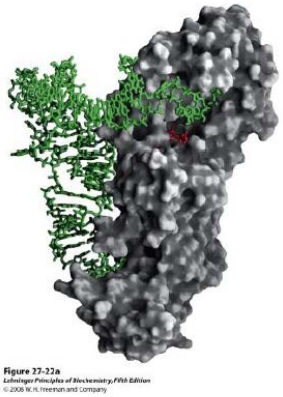
Slika 1. Prikaz sintetske reakcije aminoaciliranja enzimom aminoacil-tRNA-sintetazom (aaRS) u dva koraka. U koraku aktivacije, aaRS aktivira aminokiselinu (aa) pomoću hidrolize ATP-a u sintetskom aktivnom mjestu enzima (AS) uz oslobađanje anorganskog pirofosfata (PPi). Drugi korak jest prijenos aktivirane aa na odgovarajuću molekulu tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz Yadavalli i Ibba (2012).



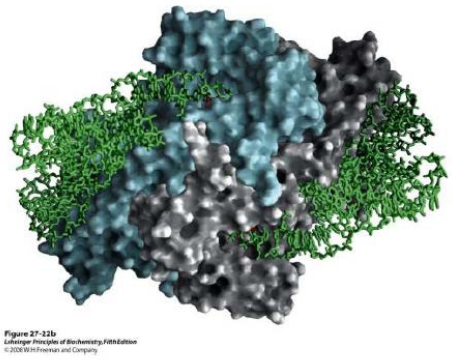
Slika 2. Stereokemijski mehanizam reakcije aminoaciliranja. Preuzeto i prilagođeno iz Perona i Gruić–Sovulj (2013).

2.2. Razredi aminoacil-tRNA-sintetaza

Svaka aaRS pripada jednom od dva razreda, razredu I ili razredu II, a izuzetak je lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) koja ima predstavnike u oba razreda (Yadavalli i Ibba 2012). Razred I obuhvaća 11 obitelji dok razred II obuhvaća 13 obitelji koje se međusobno mogu razlikovati u brojnim funkcionalnim i strukturnim karakteristikama (Perona i Gruić–Sovulj 2013). Ne smatra se da postoji zajednički predak ova dva razreda, pretpostavlja se da su se neovisno razvili prema istoj reakciji aminoaciliranja, a inicijalno je postojala samo katalitička domena u oba razreda. Tijekom evolucije enzimi su naknadno stekli dodatne domene, među kojima i domene za popravak pogreške (prema engl. *editing domains*) (Ahel i sur. 2003). U razredu I, aminoacilacijsko sintetsko mjesto posjeduje Rossmannov nabor (prema engl. *Rossmann fold*) koji sadrži dva očuvana motiva, HIGH i KMSKS. U tom mjestu se veže ATP i aminokiselina te se katalizira reakcija aminoaciliranja (Eriani i sur. 1990). Sintetaze razreda I uglavnom su monomeri, dok su pripadnici razreda II homodimeri ili tetrameri. Pripadnici razreda II posjeduju drukčiju strukturu sintetskog mjesta, antiparalelnu beta–ploču s prepoznatljivim motivima 1, 2 i 3. Motiv 1 bitan je za dimerizaciju, dok motivi 2 i 3 vežu ATP i aminokiseline. Pripadnici razreda I uglavnom vežu mali utor tRNA akceptorske peteljke i aminoaciliraju tRNA na 2'-OH kraju dok pripadnici razreda II vežu veliki utor tRNA akceptorske peteljke i aminoaciliraju 3'-OH kraj, osim fenilalanil-tRNA-sintetaze (Carter i sur. 1986). Limitirajući korak brzine katalize u razredu I jest otpuštanje aminoacilirane tRNA dok je u razredu II limitirajući korak nastajanje aminoacilirane tRNA (Perona i Gruić–Sovulj, 2013).



Glutaminil- tRNA-sintetaza (GlnRS)



Aspartil- tRNA- sintetaza (AspRS)

Slika 3. Prikazi tipičnog monomernog predstavnika razreda I (GlnRS) i dimernog predstavnika razreda II (AspRS). Crveno je prikazana molekula ATP-a, zeleno je prikazana molekula tRNA. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson i Gox (2008).

3. Mehanizmi popravka pogreške

Kao što je već spomenuto, aminoacil-tRNA-sintetaze vješto razlikuju pripadne tRNA molekule po specifičnim determinirajućim sljedovima samih molekula tRNA, a ti elementi ne djeluju isključivo zasebno, već mogu djelovati sinergistički jedni na druge čak i sa udaljenih mjesta u molekuli tRNA, povećavajući efikasnost pravilnog aminoaciliranja (Yadavalli i Ibba, 2012). Neke aminoacil-tRNA-sintetaze imaju veoma visoku specifičnost za aminokiseline, pogrešno aminoacilirajući tRNA nepripadnom aminokiselinom u otprilike 1 od 10^4 reakcija aminoaciliranja. No, aminokiseline su maleni supstrati i neke od njih pokazuju veliku strukturnu i kemijsku sličnost što predstavlja problem u njihovom efikasnom razlikovanju od strane određenih aaRS. Stoga neke aaRS češće aktiviraju pogrešnu aminokiselinu i prenesu ju na tRNA te su manje efikasne u pravilnom aminoaciliranju od drugih sintetaza. Na primjer, velika strukturna sličnost izoleucina (Ile) i valina (Val), dvije male nepolarne aminokiseline, predstavlja poteškoće za izoleucil-tRNA-sintetazu u njihovom razlikovanju. Također, sličnost dviju aromatskih aminokiselina koje se razlikuju u samo jednoj hidroksilnoj skupini, tirozina (Tyr) i fenilalanina (Phe), predstavlja problem za fenilalanil-tRNA-sintetazu koja povremeno pogrešno aktivira tirozin (Ibba i sur. 1994). Čak deset od dvadeset četiri obitelji sintetaza ne mogu razlikovati pripadne i nepripadne aminokiseline s dovoljnim stupnjem točnosti u sintetskom aktivnom mjestu. Stoga te aaRS posjeduju dodatne hidrolitičke mehanizme kojima popravljaju napravljenu pogrešku i sadrže dodatnu, prostorno odvojenu domenu za popravak vlastite pogreške (Perona i Gruić–Sovulj, 2013). U principu, sintetsko aminoacilacijsko mjesto odbija veće nepripadne aminokiseline, dok domena za popravak djeluje na manje nepripadne aminokiseline koje su se aktivirale i prenijele na molekulu tRNA.

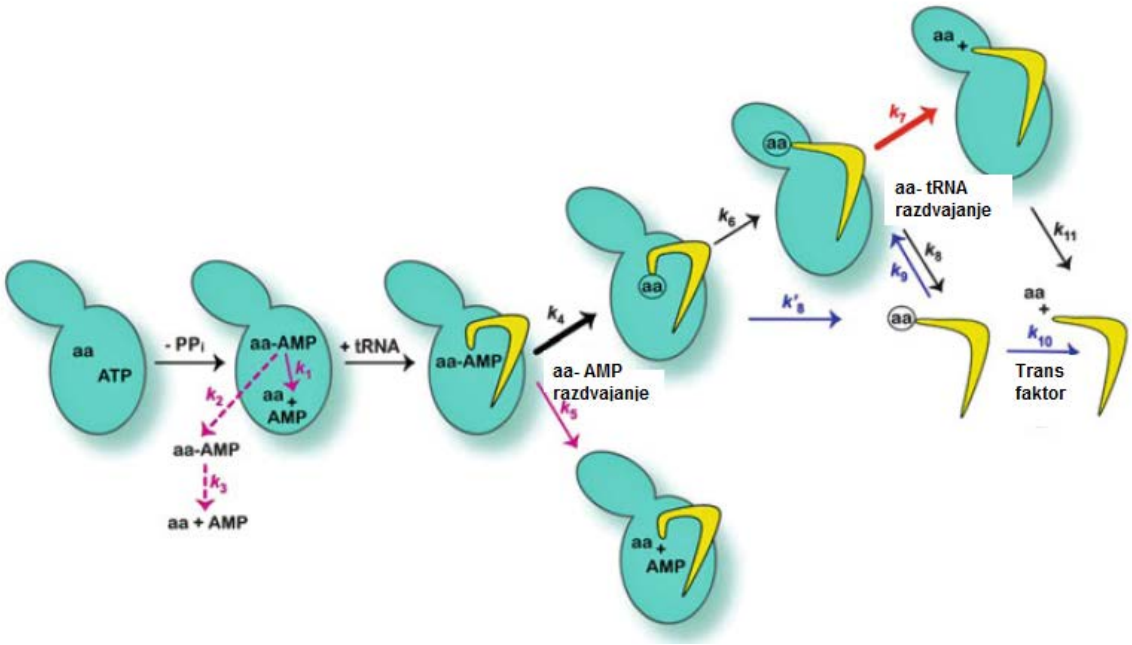
Provjera ispravnosti reakcije aminoaciliranja može se dogoditi prije drugog koraka reakcije – prijenosa aktivirane aminokiseline na odgovarajuću molekulu tRNA, ili poslije pa se tako razlikuje popravak pogreške prije prijenosa (prema engl. *pretransfer editing*) i popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA (prema engl. *posttransfer editing*) (Slika 4.)

Popravak pogreške prije prijenosa podrazumijeva hidrolizu nepripadnog aminoacil-adenilata i može se podijeliti na tri različita mehanizma. Prvi je tRNA-neovisni popravak, reakcija

katalizirana samom sintetazom u aminoacilacijskom sintetskom mjestu enzima. Drugi je također tRNA-neovisni popravak, koji se sastoji od otpuštanja pogrešno sintetiziranog intermedijera koji se neenzimatski hidrolizira u otopini (Yadavalli i Ibba, 2012). Treći mehanizam popravka pogreške prije prijenosa jest tRNA-ovisna hidroliza nepripadnog aminoacil-adenilata u sintetskom mjestu. Mehanizam popravka pogreške prije prijenosa koji je ovisan o molekuli tRNA kompetira sa samom reakcijom aminoaciliranja. Popravak pogreške je uglavnom prisutan kada je kod reakcije aktivacije nepripadne aminokiseline konstanta specifičnosti k_{cat}/K_m manja 1000 puta od pripadne reakcije, pri čemu k_{cat} predstavlja obrtni broj koji definira katalitičku aktivnost enzima, a K_m Michaelis-ovu konstantu (Perona i Gruić–Sovulj, 2013). Aminoacil-AMP se kinetički razdjeljuje između hidrolize (tRNA-ovisan popravak pogreške prije prijenosa) i prijenosa aminokiseline na tRNA, a te dvije reakcije kompetiraju u sintetskom aktivnom mjestu enzima. Ukoliko je prijenos aminokiseline na tRNA brz, onda okolna voda ne može kompetirati za nukleofilni napad, tj. k_4 jest veći od k_5 (Slika 4), što vrijedi za većinu aaRS. Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je za sada jedina sintetaza u koje je uočen relativno spor prijenos aminokiseline na tRNA, dakle k_4 je malo veći od k_5 i shodno tome značajniji je doprinos tRNA-ovisnog popravka pogreške prije prijenosa. Zbog toga je to točka koja određuje koliki će udio pogreške biti popravljen u sintetskom mjestu enzima, a ondje nepopravljene pogreške popravljaju se u zasebnoj domeni za popravak.

Popravak pogreške poslije prijenosa aktivirane aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA je dobro proučen za brojne aaRS koje posjeduju dodatnu specifiču domenu za popravak, a mjesto za popravak pogreške nalazi se 35-40 Å udaljeno od sintetskog mjesta enzima. Proučena su dva mehanizma popravka pogreške poslije prijenosa: popravak pogreške *in cis* i popravak pogreške *in trans* (disocijacija i ponovna asocijacija aminoacilirane tRNA). Popravak pogreške *in cis* podrazumijeva translokaciju jednolančanog 3' terminalnog CCA slijeda aminoacilirane tRNA iz sintetskog mjesta u domenu za popravak, gdje se vrši hidroliza nepripadne aa-tRNA bez disocijacije cjelokupne aa-tRNA na tom putu. Dokazi o popravku pogreške *in cis* dobiveni su uglavnom rendgenskom strukturnom analizom i proučavanjem struktura sintetaza razreda I (Tukalo i sur. 2005). U nekih aaRS koje pripadaju razredu II, primjećen je mehanizam popravka pogreške *in trans* tj. disocijacija i ponovna asocijacija aminoacilirane tRNA. Naime, moguće je da tijekom translokacije 3'-kraja dolazi do disocijacije pogrešno aminoacilirane tRNA koja disocira s enzima i potom se ponovo asocira ili natrag na aaRS ili u nekim slučajevima na *„trans–editing“* faktor, samostalni protein u

citoplazmi, nakon čega slijedi hidroliza misacilirane molekule tRNA (Yadavalli i Ibba, 2012). Razlika u brzinama otpuštanja pogrešno aminoacilirane tRNA jest razlog zašto aaRS razreda I preferentno popravljaju pogrešku *in cis*, dok je kod razredu II popravak pogreške *in trans* vjerojatnije zastupljeniji. Brzina disocijacije ne utječe samo na popravak pogrešno sparenih reaktanata, već i na brzinu procesa aminoaciliranja u sintetazama razreda I . Uočeno je da je brzina aminoaciliranja veća ukoliko je prisutan elongacijski faktor Tu (EF–Tu) u razredu I za aaRS koje nemaju dodatnu domenu za popravak pogreške, a razlog je uklanjanje aminoacilirane tRNA pomoću elongacijskog faktora čime se povećava obrtni broj enzima. Ipak, u aaRS razredima I i II koji imaju dodatne mehanizme popravka pogreške, sintetaze ne mogu formirati ternarni kompleks s elongacijskim faktorom EF–Tu i aa-tRNA, a razlog su steričke smetnje (Zhang i sur. 2006). Svaka pogrešno aminoacilirana tRNA koja ne podliježe procesu popravka pogreške, veže se za EF–Tu, biva zaštićena njim i sudjeluje u daljnjem procesu translacije. Kod popravka pogreške *in trans*, aaRS i EF–Tu se natječu za pogrešno aminoaciliranu tRNA (Ling i sur. 2009).



Slika 4. Kinetička razdioba aa-AMP ili aa-tRNA, hidrolitički popravak enzimom aaRS. Velika plava podjedinica enzima predstavlja sintetsko mjesto, dok mala plava podjedinica predstavlja domenu za popravak. Molekula tRNA je označena žuto. Pogrešno aminoacilirani

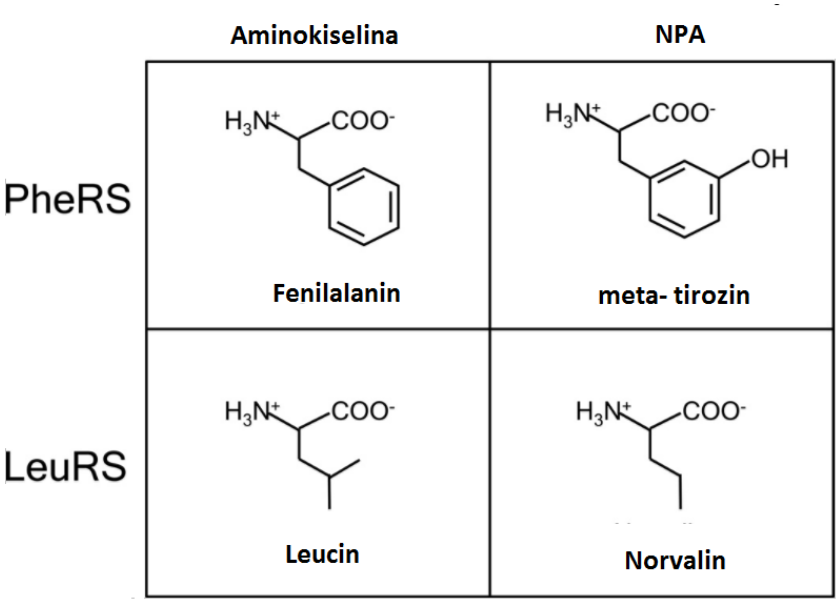
reaktanti mogu biti hidrolizirani popravkom pogreške prije (ljubičaste strelice) ili poslije prijenosa aminokiseline na tRNA (crvena strelica). Preuzeto i prilagođeno iz Perona i Gruić–Sovulj (2013).

Uzimajući u obzir važnost translacijske točnosti i negativne posljedice gubitka mehanizama za popravak pogreške, očekivalo bi se da su domene za popravak u aaRS univerzalno očuvane, proširene u svim živim organizmima i prisutne u svim sintetazama. No, postoje primjeri organizama koji su evoluirali tako da posjeduju aminoacil-tRNA-sintetaze koje su izgubile mogućnost popravka vlastite pogreške. Primjerice, ljudska mitohondrijska leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) nema domenu za popravak pogreške poslije prijenosa, no to je nadomjestila povećanom osjetljivošću razlikovanja leucina i nepripadnih aminokiselina u sintetskom aktivnom mjestu (Lue i Kelley, 2005). Također, mnoge parazitske vrste *Mycoplasma* su također evoluirale delecije i točkaste mutacije u dijelu gena koji kodira domenu za popravak pogreške u određenim aaRS, potencijalni razlog bi moglo biti povećanje broja različitih antigena koji zbunjuju imunološki sustav domaćina u kojem parazitiraju (Li i sur. 2011).

4. Neproteinogene aminokiseline kao prijetnja točnosti translacije

Bogat izvor neproteinogenih aminokiselina su prekursori i metaboliti koji se prirodno nalaze u stanici tijekom njenih uobičajnih staničnih procesa, no u uvjetima stresa neproteinogene aminokiseline mogu se akumulirati u značajnim koncentracijama i tako značajno zaprijetiti točnosti sinteze proteina. One moraju biti pravilno uklonjene ukoliko su pogrešno sparene s određenom molekulom tRNA, inače se ugrađuju u proteine. Oksidativna oštećenja uzrokovana reaktivnim kisikovim vrstama (ROS, prema engl. *reactive oxygen species*), primjerice superoksidnim ili hidroksilnim radikalima, mogu generirati nastajanje neproteinogenih aminokiselina (NPA). To se može dogoditi oksidativnim oštećenjem slobodnih aminokiselina u otopini (Gurer–Orhan i sur. 2006). Neproteinogene aminokiseline posjeduju slična strukturna i kemijska svojstva kao i proteinogene aminokiseline stoga ih aminoacil-tRNA-sintetaze mogu zabunom pogrešno aktivirati i prenijeti na molekulu tRNA, što predstavlja prijetnju translacijskoj točnosti. U bakteriji *Escherichia coli*, fenilalanil-tRNA-

sintetaza (PheRS) mehanizmom popravka pogreške poslije prijenosa sprječava otpuštanje $tRNA^{Phe}$ pogrešno aminoacilirane neproteinogenom aminokiselinom meta-tirozinom (m-Tyr). Također, leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS) u *E. coli* mehanizmom popravka pogreške poslije prijenosa sprječava otpuštanje $tRNA^{Leu}$ pogrešno aminoacilirane neproteinogenom aminokiselinom norvalinom (Nva) (Moghal i sur. 2014). Meta-tirozin se od fenilalanina razlikuje u jednoj hidroksilnoj skupini, dok se norvalin od leucina razlikuje u jednoj metilnoj skupini (Slika 5).

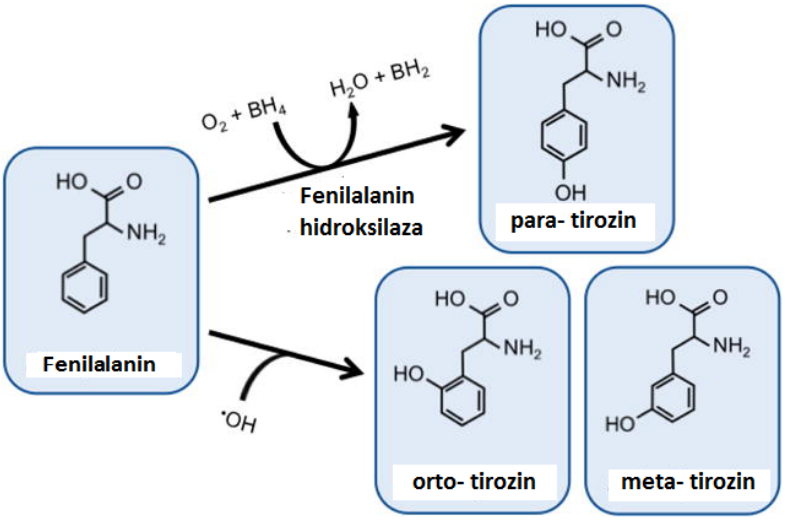


Slika 5. Neproteinogene aminokiseline (NPA), analozi proteinogenim aminokiselinama fenilalanin i leucin uz navedene aaRS koje pogrešno aktiviraju navedene NPA. Preuzeto i prilagođeno iz Moghal i sur. (2014).

4.1. Neproteinogena aminokiselina meta-tirozin (m-Tyr)

Meta-tirozin (m-Tyr) je neproteinogena aminokiselina koja nastaje oksidativnim oštećenjem fenilalanina, kao i u normalnim biosintetskim putevima u stanici, npr. biosintetskom putu šikiminske kiseline. U uvjetima oksidativnog stresa, nastali hidroksilni radikali mogu oksidirati benzenski prsten fenilalanina čine nastaju izomeri tirozina: meta-tirozin i orto-tirozin (Slika 6). Mjerenje koncentracija ova dva slobodna izomera često se koristi kao biološki marker oksidativnog stresa, a istraživanja bakterijskih, biljnih i animalnih stanica dovela su do zaključka da ovi izomeri, posebno meta-tirozin, mogu direktno oštetiti stanice i tkiva (Ipson i Fisher, 2016). Određena istraživanja su pokazala da je m-Tyr toksičan i za stanice sisavaca i da humana mitohondrijska PheRS može pogrešno aktivirati i prenijeti m-

Tyr na $tRNA^{Phe}$ te da nema mogućnost popravka sintetizirane m-Tyr-$tRNA^{Phe}$ (Klipcan i sur. 2009). Akumulacija meta-tirozina, koji se može pogrešno ugraditi u proteine, može doprinijeti narušenoj staničnoj homeostazi i razvoju određenih bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom poput ateroskleroze, dijabetesa i Alzheimerove bolesti, što ukazuje na važnost njegovog eliminiranja iz genetičkog koda (Ipson i Fisher, 2016). Biljke koriste različite neproteinogene aminokiseline kao oružje protiv herbivora ili u kompeticiji s drugim biljkama. Na primjer, određene vrste iz porodice trava koriste m-Tyr kao alelokemikaliju protiv kompetirajućih biljaka. Koriste visoke koncentracije m-Tyr (6 mM) koje izlučuju u okolno tlo, čime inhibiraju rast korijena drugih biljaka. Fitotoksičnost m-Tyr ima široki spektar djelovanja na inhibiciju rasta korijena brojnih monokotiledona i dikotiledona te se istražuje kao potencijalni herbicid (Movellan i sur. 2012). Inhibicija rasta korijena u *Arabidopsis thaliana*, tretirane m-Tyr, bila je spriječena dodatkom proteinogenih aminokiselina, posebice fenilalanina i tirozina, što ukazuje da toksičnost m-Tyr vjerojatno proizlazi iz ugradnje m-Tyr u proteine na mjesta kodirana za Phe i Tyr (Bertin i sur. 2007). Također, pokazano je da mutante *A. thaliana* otporne na tretman m-Tyr nagomilavaju Phe u povišenim koncentracijama (Huang i sur. 2010).



Slika 6. Enzimatska i radikalna hidroksilacija fenilalanina prilikom čega nastaju različiti izomeri tirozina. Preuzeto i uređeno iz Ipson i Fisher (2016).

4.2. Neproteinogena aminokiselina norvalin (Nva)

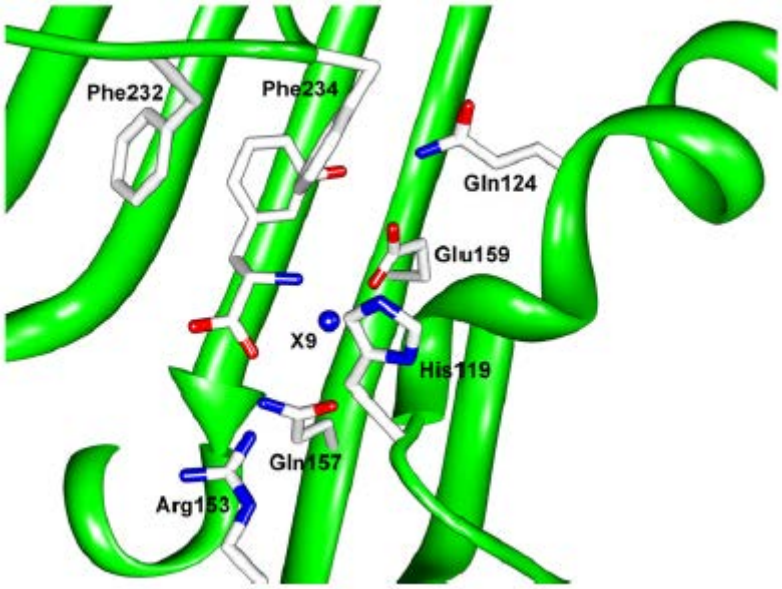
Norvalin je neproteinogena aminokiselina koja nastaje kao nusprodukt biosintetskog puta leucina (Umbarger, 1978). U uvjetima niskih koncentracija kisika, norvalin se akumulira u stanici u koncentracijama potencijalno opasnim za točnost sinteze Leu-tRNA^{Leu} u *E. coli*, ometajući pravilno funkcioniranje leucil-tRNA-sintetaze. Pad koncentracije kisika uz visoke koncentracije glukoze dovodi do pojačane biosinteze norvalina. Anaerobni uvjeti uzrokuju smanjenje staničnog rasta i akumuliranje piruvata, središnjeg metabolita u mnogim ključnim biokemijskim procesima pa tako i u biosintezi α-ketovalerata iz kojeg transaminacijom nastaje norvalin (Soini i sur. 2008). Za norvalin je još poznato da je komponenta određenog antifungalnog peptida koji proizvodi bakterija *Bacillus subtilis*, da je pronađen kao nusprodukt prozvodnje visokih koncentracija izoleucina u određenim mutantima *Serratia marcescens* te da se ugrađuje u određene rekombinantne proteine eksprimirane u *E. coli*, primjerice rekombinantni hemoglobin (Apostol i sur. 1997, Soini i sur. 2008).

5. Eliminacija neproteinogenih aminokiselina iz genetičkog koda

U odsustvu popravka napravljenih pogrešaka prilikom aminoaciliranja, stanični rast je smanjen zbog izlaganja visokim koncentracijama nepripadnih aminokiselina koje se mogu pogrešno aktivirati i prenijeti na molekulu tRNA. U odsustvu popravka pogreške od strane sintetaze, pogrešno smotani proteini se nagomilavaju, što dovodi do povećane ekspresije određenih gena uključenih u odgovor na stres u *E. coli* (Bullwinkle i Ibba, 2016). Za m-Tyr je dokazano da je toksičan za mutante bakterije *E. coli* kojima nedostaje domena za popravak pogreške enzima fenilalanil-tRNA-sintetaze (PheRS). Pogrešno aminoaciliranje tRNA^{Phe} meta-tirozinom uzrokuje ugradnju m-Tyr u proteine na mjesta kodirana za fenilalanin. Tu neproteinogenu aminokiselinu PheRS najčešće zabunom aktivira u odnosu na druge NPA. Dokazano je da je pogrešno ugrađivanje m-Tyr u proteine u mutantima *E.coli* zastupljeno u čak 2,5 % slučajeva pri subletalnim koncentracijama m-Tyr, dok je u divljem tipu učestalost 1,5 %. Ta razlika u ugradnji od samo 1 % između divljeg tipa i mutanta jest letalna za mutanta u domeni za popravak pogreške (Bullwinkle i sur. 2014). Moguće objašnjenje toksičnosti

ugradnje m-Tyr u proteine jest destabiliziranje struktura proteina i uzrokovanje smanjene aktivnosti proteina u membranskom transportnom lancu elektrona u bakterijama. To bi dovelo do nakupljanja ROS-a zbog smanjene efikasnosti redukcije kisika. ROS direktno mogu oštetiti molekulu DNA i stanične membrane putem procesa lipidne peroksidacije (Akasaka i Yamamoto, 1994). Povećane koncentracije ROS-a također mogu dodatno producirati i još veće koncentracije m-Tyr, povećavajući negativni efekt (Bullwinkle i sur. 2014). Nastajanje velikih proteinskih agregata i peroksidacija membranskih lipida uzrokuje destabilizaciju membrana i curenje sadržaja citoplazme u okolinu, što dovodi do gubitka iona, nutrijenata, homeostaze i potencijalno je signal za lizu stanice (Akasaka i Yamamoto, 1994). Eliminacija m-Tyr iz genetičkog koda iznimno je bitna za održavanje homeostaze i vijabilnosti stanica.

Fenilalanil- tRNA-sintetaza (PheRS) je heterotetramer, pripadnik razreda II aminoacil-tRNA-sintetaza koji posjeduje hidrolitičku domenu za popravak pogreške poslije prijenosa, gdje je mjesto za popravak pogreške udaljeno otprilike 30 Å od sintetskog aktivnog mjesta. Alfa-podjedinica enzima sadrži aminoacilacijsko aktivno mjesto, dok beta podjedinica sadrži jedinstvenu domenu za popravak pogreške. Mehanizmom popravka pogreške poslije prijenosa PheRS iz *E. coli* spriječava ugradnju meta-tirozina u proteine (Bullwinkle i Ibba, 2016). Enzim nema mogućnost efikasnog razlikovanja u sintetskom aktivnom mjestu. Prepoznavanje m-Tyr se postiže interakcijama benzenskog prstena supstrata sa dva fenilalanina lociranima u takozvanoj "FPF omči", tvoreći tako mrežu interakcija u aminoacilacijskom sintetskom mjestu (Slika 7). Meta-tirozinska -NH_3 skupina stvara vodikove veze sa Ser-121 i His-119 u mitohondrijskoj PheRS. Karboksilna skupina supstrata tvori vodikove veze sa Gln-157 i Arg-153. U usporedbi sa vezanjem p-Tyr, m- Tyr se dodatno stabilizira ostvarivanjem vodikovih veza između svoje hidroksilne skupine i N2 atoma Gln-124 te O2 atoma Glu-159 (Klipcan i sur. 2009).

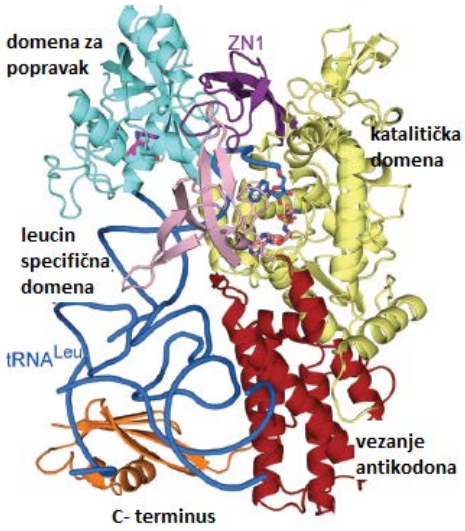


Slika 7. Struktura sintetskog aktivnog mjesta HsmtPheRS nužna za prepoznavanje meta-tirozina. X9 predstavlja molekulu vode. Preuzeto iz Klipcan i sur. (2009).

U domeni za popravak PheRS, m-Tyr je koordiniran interakcijama s Glu-334 i Gly-315. Aromatski prsten m-Tyr biva smješten u hidrofobnu okolinu. Glu-334 ima glavnu ulogu u specifičnom prepoznavanju m-Tyr, tvoreći vodikove veze s hidroksilnom skupinom m-Tyr (Klipcan i sur. 2009). PheRS provodi hidrolizu pogrešno sintetizirane m-Tyr-tRNA^{Phe} mehanizmom popravaka pogreške *in cis* (translokacijom 3'-kraja pogrešno sintetizirane m-Tyr-tRNA^{Phe}) ili popravkom pogreške *in trans* (disociracija i ponovna asocijacija aminoacilirane tRNA) (Ling i sur. 2009). Također, 3'-OH skupina A76 u tRNA^{Phe} može sudjelovati u katalizi aktivirajući okolnu molekulu vode koja je povoljno pozicionirana za nukleofilni napad, što uzrokuje nukleofilni napad i hidrolizu esterske veze u m-Tyr-tRNA^{Phe} (Ibba i sur. 2007). Popravak pogreške poslije prijenosa u PheRS je glavni način provjere kontrole kvalitete reakcije aminoaciliranja, jer pogrešno sintetiziranu m-Tyr-tRNA^{Phe} EF–Tu ni ribosomi ne mogu razlikovati od Phe-tRNA^{Phe} te zato m-Tyr-tRNA^{Phe} može biti dobar supstrat za ribosomsku sintezu proteina (Roy i sur. 2004). Iako eukariotske citosolne PheRS posjeduju sličnu strukturu kao i bakterijski enzimi te isti mehanizam popravka pogreške poslije prijenosa, njihovi mitohondrijski srodnici ne posjeduju domenu za popravak pogreške i monomeri su. Također, nije zabilježeno postojanje samostalnih „*trans–editing*“ faktora koji hidroliziraju Tyr- tRNA^{Phe} ili m-Tyr-tRNA^{Phe} (Roy i sur. 2005).

Leucil-tRNA-sintetaza (LeuRS), aminoacil-tRNA-sintetaza koja inače aktivira leucin i prenosi ga na $tRNA^{Leu}$, ponekad pogrešno može aktivirati neproteinogenu aminokiselinu norvalin (Nva) umjesto leucina. Ugradnja norvalina u proteine na mjesta kodirana za leucin uzrok je značajnom smanjenju vijabilnosti stanica u uvjetima stresa pogotovo u kompetitivnom okruženju. Norvalin se može nagomilati u stanici *E. coli* do milimolarnih koncentracija ukoliko je koncentracija kisika u okolišu značajno smanjena. Norvalin je efikasan strukturni i kemijski analog leucina, što predstavlja značajnu prijetnu translacijskoj točnosti. LeuRS (Slika 8.) stoga posjeduje posebnu domenu za popravak pogreške poslije prijenosa, koja se zove CP1 domena, gdje se vrši hidroliza misacilirane Nva-$tRNA^{Leu}$ nakon translokacije tRNA 3'-kraja iz sintetskog aktivnog mjesta enzima (Cvetešić i sur. 2016). Dugo se smatralo kako je izoleucin glavna prijetnja točnosti ispravne leucilacije, no kinetičke analize su pokazale da LeuRS razlikuje izoleucin veoma precizno prilikom sintetske reakcije u aminoacilacijskom mjestu, dok je popravak pogreške poslije prijenosa karakterističan za popravak pogrešnog aktiviranja i prijenosa norvalina na $tRNA^{Leu}$, koji predstavlja puno veću prijetnju ispravnoj leucilaciji zbog bolje aktivacije. LeuRS je pripadnik razreda I aaRS i provodi mehanizme popravka pogreške prije prijenosa (popravak neovisan o tRNA i vjerojatno fiziološki irelevantan) i popravka pogreške poslije prijenosa. Pokazuje veliku sličnost sa izoleucil-tRNA-sintetazom (IleRS) i valil-tRNA-sintetazom (ValRS) (Eriani i sur. 1990). Navedene sintetaze sadrže već spomenutu domenu CP1, odnosno konektivni peptid 1 (prema engl. *connective peptide 1*) koji se sastoji od 189 aminokiselina. Udaljenost aktivnog mjesta CP1 domene za popravak pogreške iznosi 35 Å od sintetskog aktivnog mjesta enzima (Nureki i sur. 1998). Najvažnija uloga dodatne domene za popravak pogreške u LeuRS jest eliminacija misacilirane $tRNA^{Leu}$ neproteinogenom aminokiselinom norvalinom i spriječavanje ugradnje dotične aminokiseline u proteine na mjesta kodirana za Leu u mikroaerobnim uvjetima staničnog rasta. Norvalin vjerojatno može prouzrokovati pogrešno smatanje proteina i njihovu agregaciju. Popravak pogreške misaciliranih tRNA neproteinogenim aminokiselinama jest neophodan za prilagođavanje stanica na promjenjive i nepovoljne uvjete okoliša. Norvalin u koncentraciji od 1,5 mM (koja može biti fiziološki relevantna) potpuno inhibira rast mutanti sojeva bakterija *E. coli* koje ne posjeduju funkcionalnu LeuRS domenu za popravak pogreške, dok nema utjecaja na divlji tip bakterija, što ukazuje na iznimnu važnost dodatne domene za popravak pogreške pri promjenjenim uvjetima okoliša (Cvetešić i sur. 2014). Ograničavajući korak brzine reakcije popravka pogreške poslije prijenosa može biti ili translokacija 3'-kraja misacilirane tRNA iz sintetskog mjesta u mjesto za popravak pogreške, ili otpuštanje produkata koje uključuje konformacijsku

promjenu enzima. Istraživanja sugeriraju da je proces translokacije iznimno brz, stoga je otpuštanje produkata limitirajući korak brzine reakcije. Misacilirana $tRNA^{Leu}$ vjerojatno posjeduje veći afinitet za mjesto popravka pogreške CP1 domene nego molekula tRNA koja nije aminoacilirana (Cvetešić i sur. 2012).



Slika 8. Prikaz EcLeuRS:$tRNA^{Leu}$:Ile-AMS ternarnog kompleksa. Različite domene su prikazane različitim bojama. Molekula $tRNA^{Leu}$ je prikazana plavom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz Cvetešić i sur. (2014).

Glavni mehanizam popravka pogreške kod LeuRS jest popravak pogreške poslije prijenosa *in cis*, tj. translokacija jednolančanog 3'-kraja misacilirane tRNA iz sintetskog mjesta u mjesto za popravak pogreške. LeuRS provodi i pomoćni mehanizam popravka pogreške poslije prijenosa *in trans*. Pogrešno sintetizirana Nva-$tRNA^{Leu}$ prvo disocira s enzima te se hidrolizira nakon ponovne asocijacije na LeuRS. Ključna aminokiselina u hidrolitičkoj domeni za popravak pogreške jest Asp-345. Kristalografski modeli predlažu da Asp-345 tvori ionsku interakciju s amino skupinom norvalina i omogućuje ispravno smještanje karbonilne skupine esterske veze Nva-$tRNA^{Leu}$ u hidrolitičko mjesto. LeuRS također provodi i tRNA-neovisni popravak pogreške prije prijenosa (iako vjerojatno fiziološki irelevantan), zajedničko svojstvo svim LeuRS, no pogrešno aktiviran i prenesen norvalin se popravlja isključivo popravkom pogreške poslije prijenosa. Razdjeljivanje između popravka pogreške prije prijenosa i popravka pogreške poslije prijenosa temelji se na kinetičkom natjecanju između molekule vode i molekule tRNA za nukleofilni napad na aminoacilirani AMP intermedijer. Brzi prijenos norvalina na molekulu tRNA onemogućava popravak pogreške prije prijenosa u sintetskom aminoacilacijskom mjestu enzima. Brza hidroliza pogrešno aminoaciliranih tRNA u CP1 domeni za popravak pogreške poslije prijenosa natječe se s brzinom njihove

disocijacije s enzima (Cvetešić i sur. 2012). Zbog toga je bitno da brzina hidrolize u mjestu za popravak pogreške bude velika kako bi se smanjilo „curenje“ misacilirane tRNA koja bi potom uz pomoć EF–Tu bila usmjerena na ribosome.

6. Literatura

Ahel, I., Korencic, D., Ibba, M. i Soll, D. (2003). Trans-editing of mischarged tRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100(26)**, pp.15422-15427.

Akasaka, S. i Yamamoto, K. (1994). Mutagenesis resulting from DNA damage by lipid peroxidation in the supF gene of Escherichia coli. *Mutation Research/DNA Repair*, **315(2)**, pp.105-112.

Apostol, I., Levine, J., Lippincott, J., Leach, J., Hess, E., Glascock, C., Weickert, M. i Blackmore, R. (1997). Incorporation of Norvaline at Leucine Positions in Recombinant Human Hemoglobin Expressed inEscherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, **272(46),** pp.28980-28988. Biochem 47: pp. 532 – 606

Bertin, C., Weston, L., Huang, T., Jander, G., Owens, T., Meinwald, J. i Schroeder, F. (2007). Grass roots chemistry: meta-Tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104(43)**, pp.16964-16969.

Bullwinkle, T. i Ibba, M. (2016). Translation quality control is critical for bacterial responses to amino acid stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113(8)**, pp.2252-2257.

Bullwinkle, T., Reynolds, N., Raina, M., Moghal, A., Matsa, E., Rajkovic, A., Kayadibi, H., Fazlollahi, F., Ryan, C., Howitz, N., Faull, K., Lazazzera, B. i Ibba, M. (2014). Oxidation of cellular amino acid pools leads to cytotoxic mistranslation of the genetic code. *eLife*, **3**

Carter, P., Bedouelle, H. i Winter, G. (1986). Construction of heterodimer tyrosyl-tRNA synthetase shows tRNATyr interacts with both subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83(5)**, pp.1189-1192.

Cvetesic, N., Palencia, A., Halasz, I., Cusack, S.i Gruic-Sovulj, I. (2014). The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline. *The EMBO Journal*, **33(15),** pp.1639-1653.

Cvetesic, N., Perona, J. i Gruic-Sovulj, I. (2012). Kinetic Partitioning between Synthetic and Editing Pathways in Class I Aminoacyl-tRNA Synthetases Occurs at Both Pre-transfer and Post-transfer Hydrolytic Steps. *Journal of Biological Chemistry*, **287(30)**, pp.25381-25394.

Cvetesic, N., Semanjski, M., Soufi, B., Krug, K., Gruic-Sovulj, I. I Macek, B. (2016). Proteome-wide measurement of non-canonical bacterial mistranslation by quantitative mass spectrometry of protein modifications. *Scientific Reports*, **6(1)**.

Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. i Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347(6289),** pp.203-206.

Gurer-Orhan, H., Ercal, N., Mare, S., Pennathur, S., Orhan, H. i Heinecke, J. (2006). Misincorporation of free m-tyrosine into cellular proteins: a potential cytotoxic mechanism for oxidized amino acids. *Biochemical Journal*, **395(2)**, pp.277-284.

Huang, T., Tohge, T., Lytovchenko, A., Fernie, A. i Jander, G. (2010). Pleiotropic physiological consequences of feedback-insensitive phenylalanine biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, **63(5),** pp.823-835.

Hurdle, J., O'Neill, A. and Chopra, I. (2005). Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49(12),** pp.4821-4833.

Ibba, M. (1999). Quality Control Mechanisms During Translation. *Science*, **286(5446)**, pp.1893-1897.

Ibba, M. i Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, **69(1),** pp.617-650.

Ibba, M., Kast, P. i Hennecke, H. (1994). Substrate Specificity Is Determined by Amino Acid Binding Pocket Size in Escherichia coli Phenylalanyl-tRNA Synthetase. *Biochemistry*, **33(23),** pp.7107-7112

Ipson, B. i Fisher, A. (2016). Roles of the tyrosine isomers meta-tyrosine and ortho-tyrosine in oxidative stress. *Ageing Research Reviews*, **27**, pp.93-107.

Jakubowski, H. (2001). Translational Accuracy of Aminoacyl-tRNA Synthetases: Implications for Atherosclerosis. *American Society of Nutrition Journal*s, **131.**

Klipcan, L., Moor, N., Kessler, N. i Safro, M. (2009). Eukaryotic cytosolic and mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetases catalyze the charging of tRNA with the meta-tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106(27),** pp.11045-11048.

Li, L., Boniecki, M., Jaffe, J., Imai, B., Yau, P., Luthey-Schulten, Z. i Martinis, S. (2011). Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in Mycoplasma parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108(23),** pp.9378-9383.

Ling, J., Reynolds, N. i Ibba, M. (2009). Aminoacyl-tRNA Synthesis and Translational Quality Control. *Annual Review of Microbiology*, **63(1)**, pp.61-78.

Ling, J., So, B. R., Yadavalli, S. S., Roy, H., Shoji, S., Fredrick, K., i sur. (2009). Resampling and editing of mischarged tRNA prior to translation elongation. *Mol. Cell* **33**, 654–660.

Ling, J., Yadavalli, S. S. i Ibba, M. (2007). Phenylalanyl-tRNA synthetase editing defectsresult in efficient mistranslation of phenylalanine codons as tyrosine. *RNA* **13**,1881–1886.

Loftfield, R. i Vanderjagt, D. (1972). The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochemical Journal*, **128(5),** pp.1353-1356.

Lue, S. i Kelley, S. (2005). An Aminoacyl-tRNA Synthetase with a Defunct Editing Site†. *Biochemistry*, **44(8),** pp.3010-3016.

Moghal, A., Mohler, K. i Ibba, M. (2014). Mistranslation of the genetic code. *FEBS Letters*, **588(23)**, pp.4305-4310.

Movellan, J., Rocher, F., Chikh, Z., Marivingt-Mounir, C., Bonnemain, J. i Chollet, J. (2012). Synthesis and evaluation as biodegradable herbicides of halogenated analogs of L-meta-tyrosine. *Environmental Science and Pollution Research,* **21(7),** pp.4861-4870.

Nelson, D. i Gox, M. (2008). Lehninger principles of biochemistry. 5th ed. W. H. & Company.

Nureki, O., Vassylyev, D. G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., i sur. (1998). Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* **280**, 578–582.

Perona, J. i Gruić-Sovulj, I. (2013). Synthetic and Editing Mechanisms of Aminoacyl-tRNA Synthetases. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pubmed/23852030-synthetic-and-editing-mechanisms-of-aminoacyl-trna-synthetases [Pristupila 6. 6. 2017].

Roy, H., Ling, J., Alfonzo, J i Ibba, M. (2005). Loss of editing activity during theevolution of mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem*. **280**,38186–38192.

Roy, H., Ling, J., Irnov, M. i Ibba, M. (2004). Post-transfer editing in vitro and in vivo bythe beta subunit of phenylalanyl-tRNA synthetase. *EMBO J.* **23**, 4639–4648.

Soini, J., Falschlehner, C., Liedert, C., Bernhardt, J., Vuoristo, J. i Neubauer, P. (2008). Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in Escherichia coli W3110. *Microbial Cell Factories*, **7(1)**, p.30.

Tukalo, M., Yaremchuk, A., Fukunaga, R., Yokoyama, S. i Cusack, S. (2005). The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNALeu in the post-transfer–editing conformation. *Nature Structural & Molecular Biology*, **12(10),** pp.923-930.

Umbarger, H. (1978). Amino Acid Biosynthesis and its Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, **47(1),** pp.533-606.

Wang, Y., Zhou, X., Ruan, Z., Liu, R., Eriani, G. i Wang, E. (2016). A Human Disease-causing Point Mutation in Mitochondrial Threonyl-tRNA Synthetase Induces Both Structural and Functional Defects. *Journal of Biological Chemistry,* **291(12)**, pp.6507-6520.

Yadavalli, S. i Ibba, M. (2012). Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22243580 [Pristupila 6. 6. 2017].

Zhang, C., Perona, J., Ryu, K., Francklyn, C. i Hou, Y. (2006). Distinct Kinetic Mechanisms of the Two Classes of Aminoacyl-tRNA *Synthetases. Journal of Molecular Biology*, **361(2),** pp.300-311.

7. Sažetak

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi, prevoditelji genetičkog koda bez kojih proces translacije, pa ni sam život kakav danas poznajemo, ne bi postojao. Omogućavaju pravilno sparivanje aminokiselina i pripadnih molekula tRNA te doprinose visokoj točnosti procesa translacije. Provode raznovrsne mehanizme provjere kontrole kvalitete reakcije aminoaciliranja uključujući i hidrolitičke mehanizme popravka pogrešno aktiviranih aminokiselina i aminoaciliranih tRNA. Važnost popravka pogreške mehanizmom poslije prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA (prema engl. *posttransfer editing*) kojeg provode ovi moćni enzimi pomoću svojih dodatnih domena za popravak, uočava se na primjeru norvalina i meta-tirozina. Popravak pogreške važan je za sprječavanje pogrešne aktivacije i prijenosa nepripadnih proteinogenih aminokiselina na tRNA, ali u zadnje vrijeme se uočava važnost i kod pogrešne aktivacije i prijenosa neproteinogenih aminokiselina na tRNA. Norvalin i meta-tirozin su neproteinogene aminokiseline, analozi leucina i fenilalanina koji predstavljaju veliku prijetnju točnosti procesa translacije i staničnom preživljavanju u

uvjetima stresa pogotovo u kompetitivnom okruženju. Mehanizmi popravka pogreške poslije prijenosa efikasno eliminiraju navedene aminokiseline iz genetičkog koda. Proučavanjem mehanizama popravka pogrešaka koje provode aaRS, a koji nisu uvijek i posve evolucijski očuvani, otvara se put razvitku novih antibiotika kojima su bakterijske sintetaze mete, te se omogućava bolje razumijevanje određenih bolesti i razvitak njihovih boljih tretmana.

8. Summary

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes, translators of the genetic code, without which the proces of translation, as well as life as we know it, would not exist. They precisely couple amino acids and cognate tRNA molecules, ensuring in that way a high-fidelity translation. They provide powerful mechanisms of aminoacylation quality control as well as hydrolitic editing (proofreading) of misactivated amino acids and misacylated tRNAs. The importance of posttransfer editing, which takes place within the specific editing domains of aaRS, is obvious in examples of norvaline and meta-tyrosine. Proofreading is of great significance for preventing misactivation and transfer of non-cognate proteinogenic amino acids to tRNAs, but lately its importance in preventing misactivation and transfer of non-proteinogenic amino acids to tRNAs has been noticed. Norvaline and meta-tyrosine are non-proteinogenic amino acids, analogues of leucine and phenylalanine respectively, which pose a significant threat to the accuracy of translation and celullar fitness. Posttransfer editing eliminates effectively both amino acids from the genetic code. Better understanding of the

mechanisms of aaRS proofreading opens the door to further development of new antibiotics that target bacterial enzymes, ensures more detailed insight in specific diseases and provides new and possibly more successful medical treatments.