

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Paralozi aminoacil-tRNA-sintetaza
Paralogs of aminoacyl-tRNA synthetases
SEMINARSKI RAD

Inja Radman

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Weygand- Đurašević

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

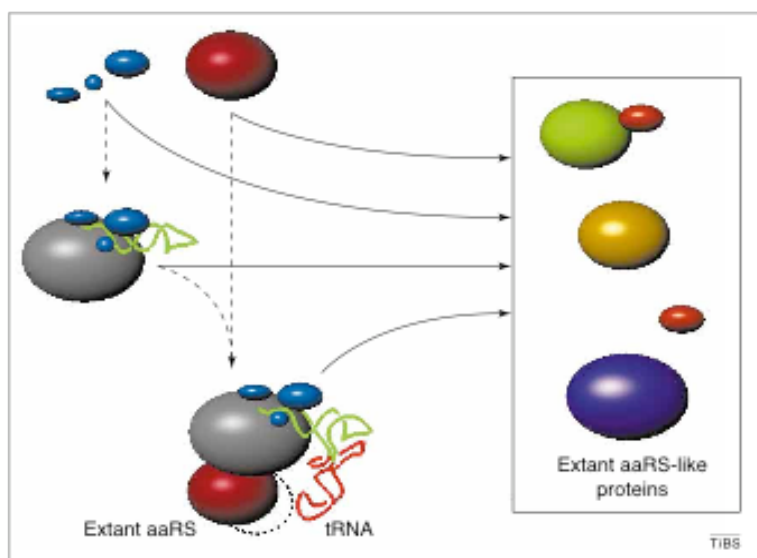
1. UVOD	2
2. PARALOZI KOJI NISU HOMOLOZI KATALITIČKE DOMENE aaRS	4
2.1. Paralog tirozil-tRNA-sintetaze: citokin EMAPII	4
2.2. Paralozi metionil-tRNA-sintetaza: Trbp111 i Arc1p	5
2.3. Paralog alanil-tRNA-sintetaze: AlaX-M	7
3. PARALOZI KOJI SU HOMOLOZI KATALITIČKE DOMENE aaRS	8
3.1. Paralog glicil-tRNA-sintetaze: pomoćna podjedinica heterodimerne mtDNA polimeraze (pol γ)	8
3.2. Paralog glutamil-tRNA-sintetaze: YadB	9
3.3. Paralog histidil-tRNA-sintetaze: HisZ	10
3.4. Paralozi aspartil-/asparaginil-tRNA-sintetaze: AsnA i AsnRS2	11
3.5. Paralozi seril-tRNA-sintetaze: At, Bj1 i Bj2	13
3.5.1. Biokemijska i strukturalna svojstva paraloga	15
3.5.2. Funkcija paraloga i genomska okolina	19
4. ZAKLJUČAK I RASPRAVA	20
5. LITERATURA	22
6. SAŽETAK	24
7. SUMMARY	24
8. ZAHVALE	25

1. UVOD

Tijekom posljednjih 50 godina proces sinteze proteina rastumačen je do najsitnijih detalja; ipak, riješene zagonetke dale su podlogu za nastanak brojnih novih neriješenih. Kako to često i biva u znanosti, što se glavna staza koju slijedimo bolje vidi, to nailazimo i na sve više sporednih slijepih stazica i mračnih koridora, u kojima mogu stajati skrivena nova blaga. Jedan od takvih tajnih kutaka zakrio je i priču paraloga aminoacil-tRNA-sintetaza, a ja ću je kroz ovaj seminar pokušati rasvijetliti kratkim osobnim istraživanjem dosad napravljenog na tom području.

Proces translacije proteina na ribosomima može se sumirati kao: prijenos aminokiseline na odgovarajuću tRNA putem aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS), vezanje aminoacilirane tRNA za elongacijski faktor, tRNA:mRNA dekodiranje. Aminoacilacija se odvija u dva koraka: u prvom uz utrošak ATP-a nastaje aminoaciladenilat, koji u drugom koraku prenosi aminokiselinu na 3'-kraj odgovarajuće molekule tRNA uz oslobađanje AMP-a. Dugo se mislilo prema klasičnoj Crickovoj hipotezi adaptor (Crick, 1958) da postoji točno po jedna zasebna aaRS za svaku aminokiselinu. Iako je takva relacija uopćeno gledajući ispravna, tijekom posljednjih 15 godina pokazalo se da je situacija znatno kompleksnija: više aaRS mogu biti odgovarajuće za prijenos jedne aminokiseline, a isto tako ponekad jedna aaRS može biti odgovorna za prijenos više aminokiselina. Štoviše, u genomu mnogih organizama pronađene su brojne homologne kopije sekvenci čitavih aaRS ili samo nekih njihovih podjedinica nastalih, pretpostavlja se, duplikacijama tijekom evolucije (Stathopoulos i sur., 2001, Schimmel i Ribas De Pouplana, 2000). Usto, priličan broj takvih sekvenci kod arheja bakterijskog je porijekla, što izravno potvrđuje horizontalni prijenos gena (Woese i sur., 2000). U nekim slučajevima, homolozi su zadržali istu funkciju, ali su specifični utoliko što se aktiviraju tek u neobičnim staničnim uvjetima, kao što su povišena temperatura ili stanje gladovanja (primjećujemo da takve homologe ne zovemo paralozima, obzirom na to da definicija paraloga zahtijeva specijaciju prema novoj funkciji nakon duplikacije). Druga skupina homologa, brojnija i zanimljivija, su upravo pravi paralozi koji sadrže tek neki dio polipeptida aaRS i čija funkcija nije vezana za ribosomsku proteinsku sintezu. Vidjet ćemo da kod njih nailazimo na čitavu zbirku struktura i funkcija.

Za bolje razumijevanje evolucije paraloga aaRS, potrebno je dati kratak osvrt na pretpostavljeni evolucijski scenarij aaRS te na strukturu i arhitekturu aaRS kao glavni produkt tog scenarija. Prema izvorima (Schimmel i Ribas De Pouplana, 2000), najstarija komponenta aaRS je upravo domena koja provodi sintezu adenilata, nazvana danas katalitičkom domenom (engl. *catalytic domain*). Ona je u početku mogla aktivirati aminokiseline, a s vremenom je spajala na sebe druge podjedinice, čitave nove domene zaslužne za vezivanje RNA-molekula. Manje insertirane podjedinice vezivale su prvo oligonukleotide RNA nalik jednoj od domena današnje tRNA, a tek kasnije vezanje druge veće podjedinice, nazvane danas antikodon-veznom domenom (engl. *anticodone-binding domain*), omogućilo je idealne interakcije za specifično prepoznavanje tercijarne strukture tRNA-molekule (Slika 1.). Jasno je da su različitim kombiniranjem manjih i većih podjedinica mogli nastati brojni aaRS-slični proteini; štoviše, dovoljna je tek jedna podjedinica za obavljanje neke od funkcija.



Slika 1. Pretpostavljeni model za evolucijski razvoj i nastanak aminoacil-tRNA-sintetaza i njihovih homologa (preuzeto iz Schimmel i Ribas De Pouplana, 2000)

Aminoacil-tRNA-sintetaze dijele se u dvije podskupine, tzv. razred I i razred II. Važno je napomenuti da je podjela na razrede načinjena upravo na temelju «arhaične» katalitičke podjedinice, tj. na temelju njene strukture te mehanističkih svojstava, uključujući konformaciju ATP-a u aktivnom mjestu te specifičnost mehanizma prijenosa i uspostavljenih interakcija.

Do danas identificirani paralozi aaRS uglavnom sadrže samo jednu homolognu domenu njihove srodne aaRS, većinom katalitičku. Manji broj paraloga sadrži homologe druge velike domene, antikodon-vezne domene. Moguća je i kombinacija u kojoj paralozi imaju sekvencu homolognu objema domenama. Na temelju ovog kriterija odlučila sam provesti podjelu najzanimljivijih i dobro okarakteriziranih paraloga. Posebno ću se osvrnuti na dva paraloga s kojima sam osobno upoznata, novootkrivene paraloge seril-tRNA-sintetaza.

2. PARALOZI KOJI NISU HOMOLOZI KATALITIČKE DOMENE aaRS

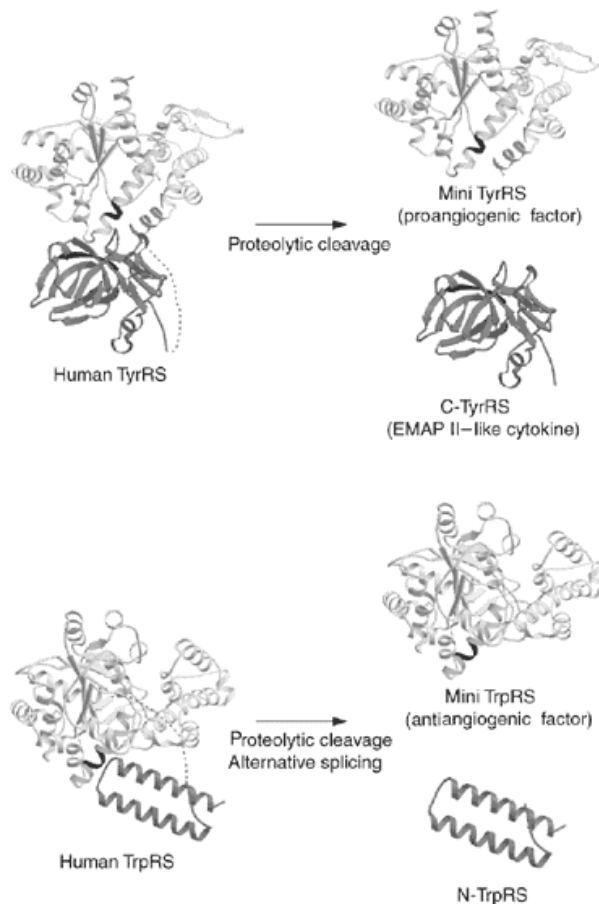
Dosad nađeni paralozi iz ove skupine imaju sekvencu homolognu ili antikodon-veznoj domeni ili domeni za provjeru ispravnosti vezanja i hidrolitički popravak (engl. *editing domain*). Ovdje spadaju paralozi tirozil- (TyrRS), metionil- (MetRS), fenilalanil- (PheRS) i alanil-tRNA-sintetaza (AlaRS). Najnovije otkriveni su upravo AlaRS-paralozi.

2.1. Paralog tirozil-tRNA-sintetaze: citokin EMAPII

Citokin EMAPII (endotelijski monocit-aktivirajući polipeptid II) važan je za indukciju faktora prokoagulacijskih aktivnosti u endotelnim stanicama (Kao i sur., 1994). Potiče migraciju monocita i kemotaksičan je za granulocite. Aktivno mjesto nalazi mu se u N-terminalnoj regiji; pokazano je eksperimentalno da sintetski peptid od 15 aminokiselina iz N-terminalne regije inducira usmjerenu migraciju mononuklearnih fagocita i polimorfonuklearnih leukocita (Kao i sur., 1994). Paralogom aaRS ga čini druga, neobična C-terminalna domena homologna sekvenci C-terminalne domene nađene isključivo kod tirozil-tRNA-sintetaza sisavaca (Kleman i sur., 1997). Ova domena nije katalitička i kao takva nije ključna za aminoacilaciju.

Zanimljivo je da tirozil-tRNA-sintetaza sisavaca ne posjeduje citokinsku aktivnost, ali specifičnim cijepanjem nekim izvanstaničnim proteinima (npr.

leukocitnim elastazama) može dati funkcionalnu C-terminalnu domenu koja pokazuje jednake citokinske aktivnosti kao i EMAPII (Wakasugi i Schimmel, 1999, Slika 2.). Izvanstanični proteini koji uzrokuju ovakvo cijepanje oslobađaju se najčešće iz stanica koje su u procesu apoptoze. Također je zanimljivo da osim ove domene homologne tirozil-tRNA-sintetazama, EMAPII posjeduje i kraće sekvence homologne nekoliko drugih aaRS.



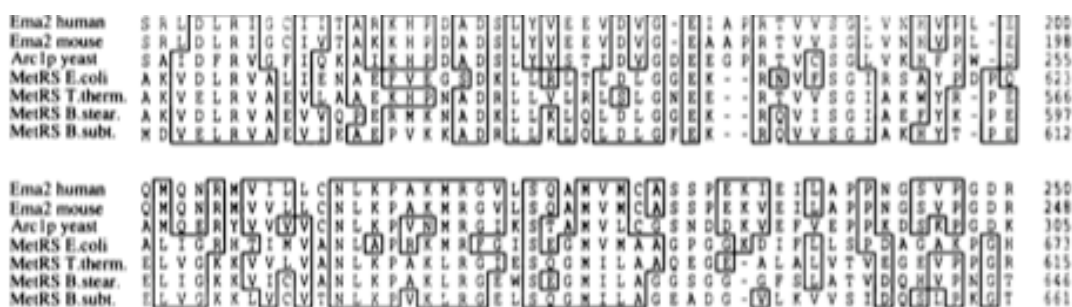
Slika 2. Cijepanje domena u ljudskim tirozil- i triptofanil-tRNA sintetazama aktivira 2 enzima koja sudjeluju u regulaciji angiogeneze (preuzeto s <http://www.scripps.edu/news/sk/sk2004/sk04schimmel.html>).

2.2. Paralozi metionil-tRNA-sintetaza: Trbp111 i Arc1p

Paralog MetRS pronađen kod hipertermofila *Aquifex aeolicus* nazvan je Trbp111, na temelju svoje 111 aminokiselina duge sekvence te strukturno-specifičnog vezivanja molekule tRNA. Riješena struktura ovog proteina i njegovog *E. coli* homologa pokazale su da se radi o simetričnom dimeru koji se sastoji od dvije

monomerne glavne domene međusobno povezane središnjom dimerizacijskom domenom (Swairjo i sur., 2000). Glavne domene monomera zapravo su homolozi antikodon-vezne domene MetRS i izgrađene su od peterolančane bačve i male poklapajuće zavojnice. Ovaj protein specifično veže tRNA L-oblika, točnije, interakcija se odvija upravo s vanjskim kutem molekule L-oblika. Štoviše, eksperimentalno je pokazano da Trbp111 ostvaruje interakcije i sa strukturom nalik molekuli tRNA, izgrađenom od nekoliko nekovalentno povezanih tRNA-domena, dok interakcije s pojedinicima od tih domena nisu zapažene (Kushiro i Schimmel, 2002). Pretpostavlja se da kofaktori poput Trbp111 pomažu u slaganju i stabilizaciji RNA-dimera koji su nalik na tRNA.

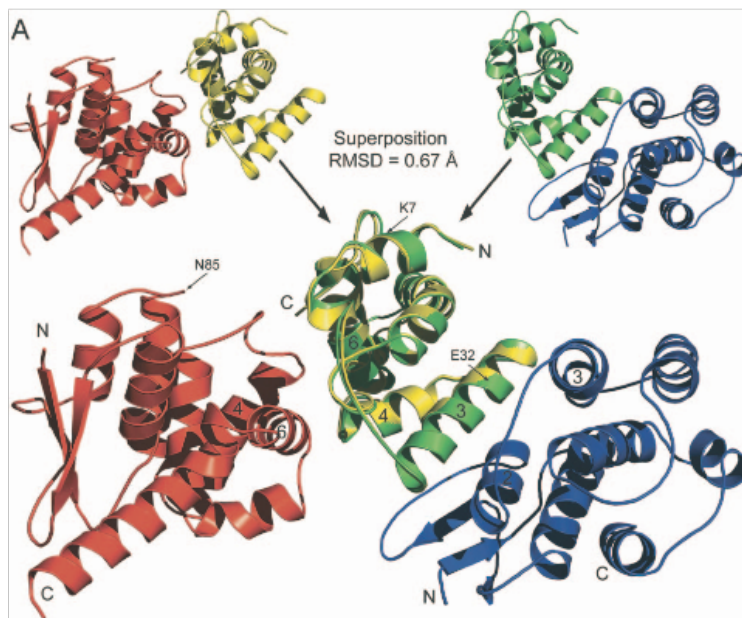
Eukariotski paralog MetRS pronađen kod *Saccharomyces cerevisiae*, nazvan Arc1p, također veže tRNA-molekulu, a pretpostavljena mu je funkcija kofaktora pri aminoacilaciji MetRS. Otkriven je tijekom pokušaja detekcije proteina koji su u interakciji s Los1p, proteinom vezanim za jezgrinu poru kod kvasca koji sudjeluje u biogenezi tRNA.



Slika 3. Regija prvih 100 aminokiselina C-terminalne domene Arc1p kod kvasca homologna je C-terminalnoj domeni mnogih bakterijskih MetRS (preuzeto iz Simos i sur., 1996).

Ključni proteini koje Arc1 veže su metionil- i glutamil-tRNA-sintetaza. Mutacije ARC1 gena uzrokuju usporen rast stanica kvasaca te smanjenu aktivnost MetRS (Simos i sur., 1996). Kroz posljednjih 10 godina riješene su strukture pojedinih enzimatskih podjedinica MetRS, ali je zanimljivo da je tek nedavno riješen kompleks kvašćevih aaRS, kod kojeg su u interakciji MetRS, GluRS i Arc1. Model je dobiven superpozicijom zasebnih kompleksa MetRS-Arc1 i GluRS-Arc1 (Slika 4.). Strukturna analiza pokazala je da sva tri proteina poprimaju karakteristično slaganje nalik GST-proteinu te da je istovremena interakcija Arc1p s MetRS i GluRS

omogućena stvaranjem nove dodirne površine, kao dodatak standardnoj dimerizacijskoj površini koju posjeduje GST (Simader i sur., 2006).



Slika 4. Model GluRS-N-Arc1p-N-MetRS-N trojnog kompleksa nastao superpozicijom riješenih struktura zasebnih dvojnih kompleksa. Oznake na slici: C- C-terminus, N- N-terminus, Arc1p K7, E32 i GluRS N85 – aminokiseline koje označuju granice delecijjskih konstrukata korištenih (preuzeto iz Simader i sur., 2006).

2.3. Paralog alanil-tRNA-sintetaze: AlaX-M

Jedan od novije otkrivenih paraloga, paralog AlaRS nazvan AlaX-M, dijeli homologiju u sekvenci s domenom za provjeru ispravnosti vezanja i hidrolitički popravak AlaRS. Ta domena za hidrolitički popravak, tj. ispravljanje pogrešaka tijekom enzimske aktivnosti AlaRS znatno pridonosi preciznosti i točnosti procesa aminoacilacije; ona hidrolitički cijepa neispravne produkte Ser-tRNA^{Ala} i Gly-tRNA^{Ala}. Tri su tipa AlaX-proteina nađena, a razlikuju se po broju aminokiselina (AlaX-S, AlaX-M i AlaX-L). Riješena je kristalna struktura AlaX-M proteina izoliranog iz vrste *Pyrococcus horikoshii*, koji katalizira deacilaciju pogrešno vezanog serina i glicina s tRNA^{Ala}. Uočena je evolucijski očuvana skupina aminokiselina C-terminalne domene koja veže, tj. koordinira ion cinka, i pretpostavlja se da je upravo taj dio C-terminalne domene aktivno mjesto enzima. Uočen je također motiv bogat

glicinom, sačinjen od uzastopnih očuvanih glicina u N-terminalnoj domeni, koji čini tzv. glicin-bogatu petlju (engl. *glycine-rich loop*). Petlja se prostorno nalazi u blizini aktivnog mjesta i mogla bi biti uključena u prepoznavanje supstrata i/ili katalizu (Fukuhama, Yokoyaga, 2007).

3. PARALOZI KOJI SU HOMOLOZI KATALITIČKE DOMENE aaRS

Ovo je brojnija skupina u koju spada većina dosad nađenih paraloga, a to su redom paralozi: aspartil- (AspRS), asparaginil- (AsnRS), glutamil- (GluRS), glicil- (GlyRS), histidil- (HisRS), lizil- (LysRS) te seril-tRNA sintetaza (SerRS). Poseban je slučaj GlyRS-paralog jer je njegova sekvenca homologna i katalitičkoj i antikodon-veznoj domeni odgovarajuće sintetaze.

3.1. Paralog glicil-tRNA-sintetaze: pomoćna podjedinica heterodimerne mtDNA polimeraze (pol γ)

Iako isprva nikada ne bismo očekivali vezu aminoacil-tRNA-sintetaza i sinteze DNA, ona postoji. Paralog glicil-tRNA-sintetaze, protein pronađen samo u eukariotima, i to prvenstveno u *Drosophila melanogaster* i *Xenopus laevis*, pomaže upravo pri sintezi DNA tako što potiče procesivnost. Znanstvenici predlažu da je ova pomoćna podjedinica (β -podjedinica) mitohondrijske DNA polimeraze (pol γ) uključena i u proces prepoznavanja početnice i u proces elongacije nastajuće molekule DNA. Kao takva, nužna je za održanje strukturne cjelovitosti holoenzima te za njegovu katalitičku učinkovitost. Eksperimentalno, dodavanjem pomoćne podjedinice mtDNA polimeraze iz vrste *Xenopus laevis* humanoj glavnoj katalitičkoj podjedinici mtDNA polimeraze, pri normalnim fiziološkim uvjetima, znatno se povećala procesivnost polimeraze (Carrodeguas i sur., 1999).

Pokazano je da je ova pomoćna podjedinica eukariotske pol γ homologna i sekvencom i strukturom cijeloj klasi IIa aaRS, a posebice GlyRS (Fan i sur., 2006). Zanimljivo je da je homologija zapažena za obje glavne domene aaRS, katalitičku i

antikodon-veznu, kao što je već navedeno. Iako je prostornom strukturom C-terminalna domena upravo karakteristična antikodon-vezna domena klase II aaRS (neobična peterolančana β -nabrana ploča okružena s 4 α -zavojnice), funkcionalno nije pokazana nikakva veza s biosintezom aminokiselina ili vezivanjem molekule tRNA.

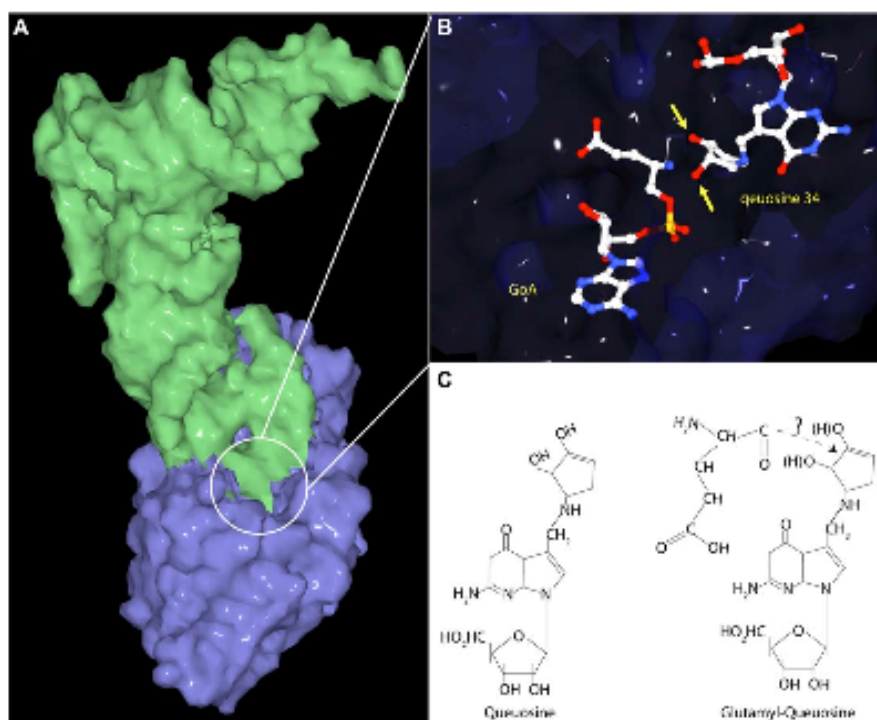
3.2. Paralog glutamil-tRNA-sintetaze: YadB

Analizama ukupnih bakterijskih genomskih sekvenci nađeni su brojni paralozi aaRS na temelju njihovih otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frame*; ORF), a jedan od najbolje očuvanih je paralog GluRS nazvan YadB. Sekvenca ovog paraloga pronađena je u genomu više od 40 vrsta proteobakterija, cijanobakterija i aktinobakterija te mu je funkcija očuvana u prokariota. Gen *yadb* eksprimiran u *Escherichia coli* kodira za krnju GluRS kojoj nedostaje C-terminalna antikodon-vezna domena. Za razliku od klasične GluRS, YadB aktivira glutamat u prisutnosti ATP-a bez posredstva molekule tRNA te ga prenosi na tRNA^{Asp} (tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln} nisu supstrati). Također, zapažena je razlika u procesu esterifikacije: glutamat se ne veže na 3'-završni adenzin tRNA^{Asp}, već na modificirani nukleotid (nukleotid Q; engl. *queuosine*) na prvoj antikodonskoj poziciji (Slika 5.). Ova se esterska veza lako hidrolizira već pri blagim lužnatim uvjetima i pretpostavlja se da je zato bila teže primjećena, obzirom na to da je jedan od standardnih koraka pri izolaciji tRNA lužnata deacilacija. Analiza izolirane tRNA u kiselim uvjetima potvrdila je nastajanje ovakve veze kod normalne tRNA *E. coli* (Salazar i sur., 2004).

Što se tiče same homologije s GluRS, poravnanja su pokazala 34 % identiteta sekvence YadB s GluRS *E. coli* te 23 % identiteta sa strukturno sličnom i srodnom GlnRS (Lamour i sur., 1994). Strukturna sličnost pokazana je za katalitičku domenu, i to još više za GluRS iz *Thermus thermophilus* nego iz *E. coli* (karakteristični tzv. *Rossmann-fold*). Na temelju mape elektronske gustoće uočena je skupina aminokiselina koje koordiniraju cinkov ion, kao što je slučaj i za GluRS *E. coli* i *Bacillus subtilis*, kod kojih je ion cinka ključan za mehanizam procesa aminoacilacije (Liu i sur., 1993).

Usporedbe sekvenci pokazale su i strukturno oponašanje antikodonske petlje tRNA^{Asp} i petlje za prihvaćanje aminokiseline klasične tRNA^{Glu}. Ovo otkriće izmijenilo je paradigmu prema kojoj katalitička domena aaRS prepoznaje isključivo

petlju za prihvaćanje aminokiseline tRNA i aminoacilira isključivo 3'-završnu ribozu. YadB se naziva još i glutamil-Q-tRNA^{Asp}- sintetaza.



Slika 5. Model interakcije Glu-Q-RS s tRNA^{Asp} (pod pretpostavkom da ciklopentenski prsten Q34 treba biti blizu aktivirane karboksilne skupine Glu iz Glu-AMP/ GoA analoga ovdje); A- Površine YadB i tRNA^{Asp} su plave i zelene redom; B- Približene pozicije GoA i Q u aktivnom mjestu; C- Strukture nukleotida Q i spoja Glu-Q ukazuju da glutamilirani –OH ciklopentenskog prstena nije identificiran (preuzeto iz Blaise i sur., 2004).

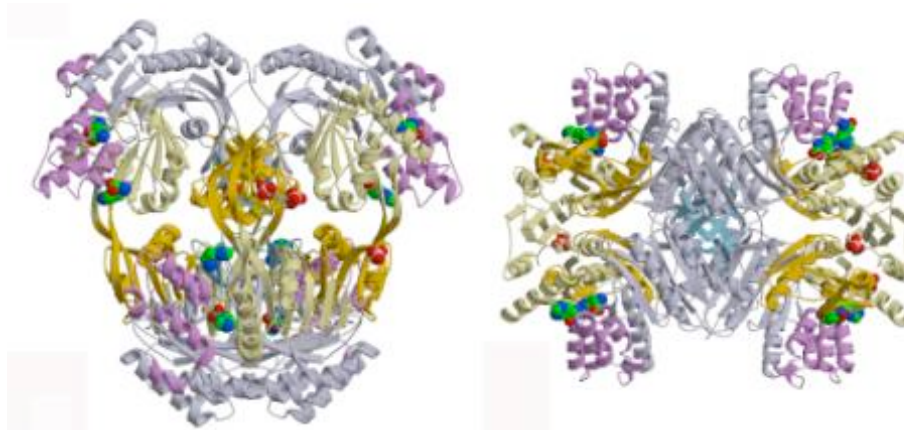
3.3. Paralog histidil-tRNA-sintetaze: HisZ

N-1-(5'-fosforibozil)-ATP-transferaza (kodirana s *hisG*) enzim je koji katalizira kondenzaciju ATP-a s PRPP-om u biosintezi histidina. Za katalitičku aktivnost ATP-fosforibozil-transferaze, kod vrste *Lactococcus lactis*, kao i kod brojnih drugih bakterijskih vrsta (za razliku od *E.coli*, npr.), potrebna su dva odvojena polipeptida. Jedan od njih je oko 100 aminokiselina kraća verzija klasične transferaze kodirane *hisG*-lokusom. Drugi je 328 aminokiselina dugačak polipeptid koji je paralog histidil-tRNA-sintetaze iz razreda II i ne posjeduje aminoacilacijsku funkciju, HisZ.

Opisana je cijela klasa HisZ proteina na temelju homologije s katalitičkom podjedinicom HisRS. Kod svih organizama sa skraćenom verzijom HisG proteina,

kompleks HisG-HisZ nužan je za odvijanje reakcije ATP-fosforibozil-transferaze, što je eksperimentalno potvrđeno komplementacijskim testovima i afinitetnom kromatografijom (Sissler i sur., 1999).

Riješena kristalna struktura ATP-fosforibozil-transferaze iz hipertermofila *Thermotoga maritima* je hetero-oktamerni kompleks izgrađen od 4 katalitičke podjedinice (HisGS) i 4 regulatorne podjedinice (HisZ). Eksperimenti kinetike ustaljenog stanja (engl. *steady-state kinetics*) pokazali su da je samo cjelokupan oktamerni kompleks aktivan i nekompetitivno inhibiran produktom biosintetskog puta, histidinom. Objašnjenje tog rezultata nađeno je u 8 histidinskih veznih mjesta koja nastaju na svakoj od 4 HisGS-HisZ prijelazne površine u kompleksu (Vega i sur., 2004, Slika 6.). Zajedničko porijeklo HisZ i HisRS može biti posljedica regulacije količine odgovarajuće aminokiseline (histidina) za proces translacije, koja je povezala tako biosintezu aminokiselina i proteina u funkciji, strukturi i evoluciji.



Slika 6. Struktura hetero-oktamernog ATP-fosforibozil-transferaza kompleksa; HisG- žuto, HisZ- sivo/ljubičasto, fosfatni ioni i histidini prikazani atom-specifičnim bojama (Vega i sur., 2004)

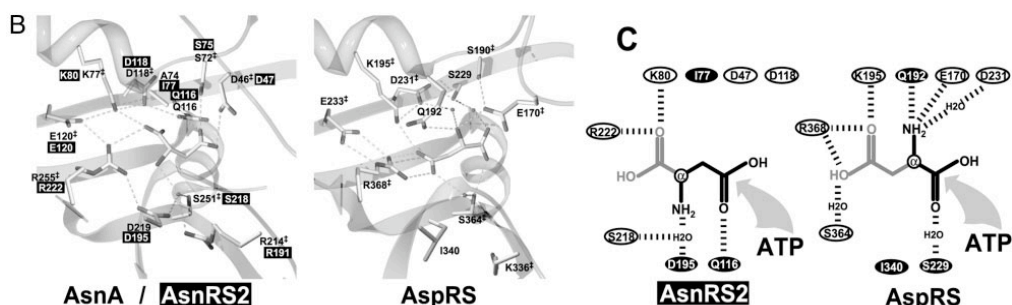
3.4. Paralozi aspartil-/asparaginil-tRNA-sintetaze: AsnA i AsnRS2

Mnogi su paralozi aminoacil-tRNA-sintetaza detektirani analizama cjelokupnih genoma i otvorenih okvira čitanja (ORF), a jedan od njih je i paralog AsnRS. Kod arheja općenito, analizama genoma zabilježene su dva okvira čitanja koja kodiraju za asparaginil-tRNA-sintetazu: jedan od njih kodira za klasičnu kanonsku AsnRS, dok drugi kodira visokosrodnu katalitičku podjedinicu AsnRS, nazvanu AsnRS2. Detaljno su istražena svojstva te evolucija ovog paraloga u

hipertermofilnoj vrsti *Pyrococcus abyssi* (Roy i sur., 2003). AsnRS2 je 294 aminokiseline dugačak protein kojem nedostaje prvih 100-tinjak N-terminalnih aminokiselina (antikodon-vezna domena) njegovog «originala», a identičan mu je u genskoj sekvenci 39 %. Rezultati su pokazali da AsnRS2 ne provodi aminoacilaciju tRNA^{Asn} odgovarajućom aminokiselinom kao što radi kanonska verzija; AsnRS2 provodi sintezu asparagina amidacijom aspartata.

Kod bakterijskih organizama koji ne posjeduju asparaginil-tRNA-sintetazu, asparaginil-tRNA mora nastati tzv. izravnim putem u dva koraka: prvo nediskriminirajuća AspRS mora provesti aspartilaciju tRNA^{Asn}, a zatim se nastala Asp-tRNA^{Asn} mora amidirati glutamin-amidottransferazom (GluCAB). Pokazano je da kod arheja (konkretno, kod *P. abyssi*) ovaj izravni put sinteze asparagina obavljaju AsnRS i AsnRS2 u suradnji.

Kakve veze s cijelom pričom ima protein AsnA, tj. asparagin-sintetaza A? Eksperimenti funkcionalne analize i komplementacije u *E. coli* auksotrofnoj za asparagin pokazali su da je arhealni AsnRS2 zapravo homolog bakterijskog proteina AsnA, enzima koji provodi sintezu asparagina za koju je potreban amonijak (Roy i sur., 2003).

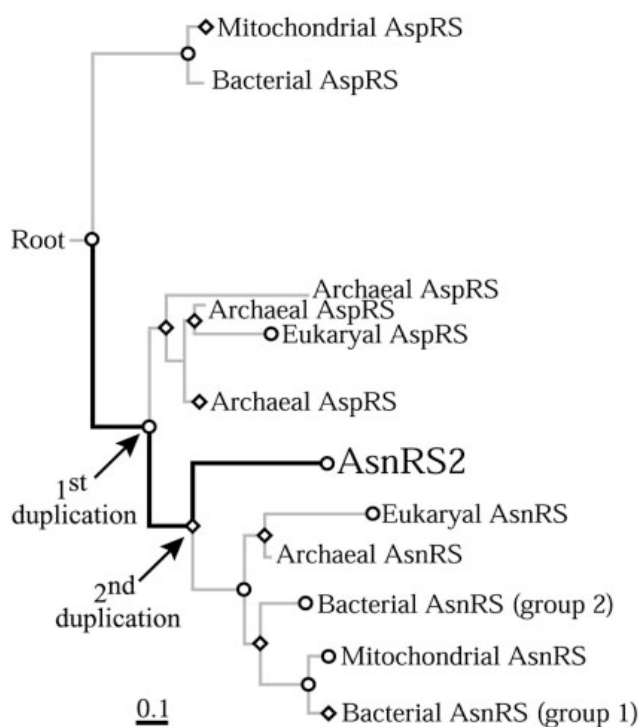


Slika 7. Usporedba aktivnih mjesta AsnA/AsnRS2 i AspRS; B) 3D strukture, AspRS-Asp-AMP i AsnA-Asn-ATP; C) 2D prikaz mehanizma prepoznavanja Asp (preuzeto iz Roy i sur., 2003)

Zanimljivo je da su oba ova homologa, AsnA i AsnRS, povezani i s aspartil-tRNA-sintetazama, od kojih se pretpostavlja da su evolucijski potekli, kao i AsnRS općenito. Pokazana je izrazita strukturalna homologija AsnA i katalitičke domene AspRS proteina, kao i posjedovanje zajedničkog motiva 3, jedne od karakterističnih sekvenci aaRS iz razreda II (Nakatsu i sur., 1998). Riješene strukture AsnA, AsnRS i AsnRS2 u kompleksu s AMP-om pokazale su iste interakcije ostvarene u AsnA i AsnRS2 važne za specifičnost njihove funkcije te razlike u aktivnom mjestu ta dva

proteina u odnosu na AsnRS koje im omogućuju sintezu asparagina i onemogućuju aminoacilaciju (Roy i sur., 2003, Slika 7.).

Pretpostavlja se da su svi ovi homologni proteini evoluirali iz arhealnog/eukariotskog AspRS-proteina, i to kroz dvije genske duplikacije: jednu koja se dogodila u zajedničkom pretku i drugu koja se dogodila kasnije u arhejama (Slika 8.) Grana bakterijske AsnA razvila se prema tom modelu iz arhealne AsnRS2 putem horizontalnog prijenosa gena (Roy i sur., 2003).



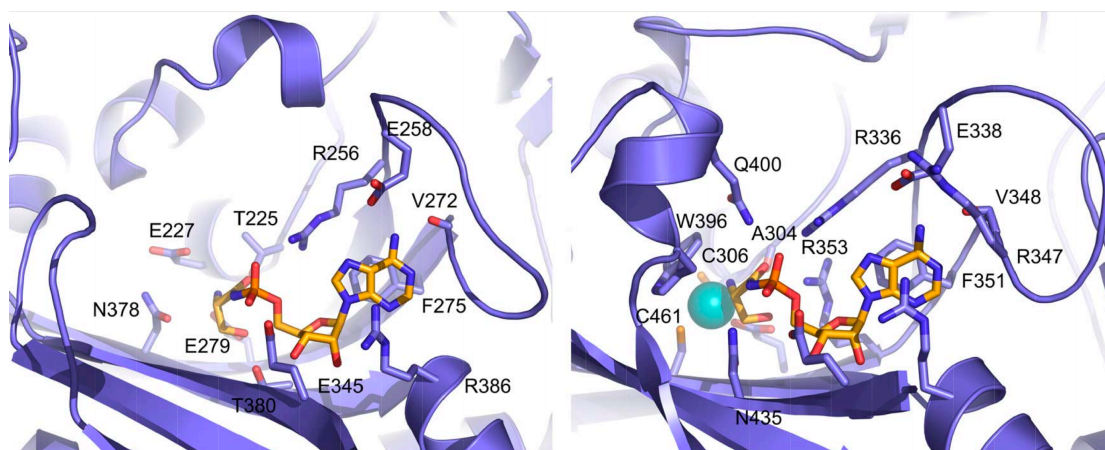
Slika 8. Modeliranje porijekla arhealnog Asn metabolizma ovisnog o amonijaku; na temelju poravnanja sekvenci pomoću ClustalX; sekvenca LysRS korištena kao vanjska skupina (preuzeto iz Roy i sur., 2003).

3.5. Paralozi seril-tRNA-sintetaze: At, Bj1 i Bj2

Ovi su paralozi također pronađeni analizom potencijalnih ORF-ova u brojnim bakterijskim genomima. Još uvijek im se ne zna točna funkcija i predmet su istraživanja. Radi se o paralozima posebne metanogene podvrste seril-tRNA-sintetaza (mSerRS), koji se u genomima organizama pojavljuju kao dodatni geni, uz prisutnost klasične SerRS bakterijskog tipa. Kao predmet istraživanja (Zavod za Biokemiju,

PMF Zagreb) dosad su izabrani paralozi iz *Agrobacterium tumefaciens* (At) te dva slična paraloga iz *Bradyrhizobium japonicum* (Bj1, Bj2). Kako bismo ih mogli što bolje razumjeti, potrebno se prvo upoznati s glavnim obilježjima metanogenih SerRS.

Neobične, evolucijski udaljene metanogene SerRS nađene su, kako im samo ime kaže, isključivo kod metanogenih arheja. Iako su homodimeri i obavljaju istu funkciju kao i klasična podskupina SerRS bakterijskog tipa, tj. aminoaciliraju tRNA serinom, od njih se znatno razlikuju strukturno, mehanistički i evolucijski. Već na razini homologije samih sekvenci (primarnih struktura) ove dvije podskupine znatno se razlikuju; štoviše, nađena je jako slaba sličnost karakterističnih očuvanih motiva specifičnih za klasu II aminoacil-tRNA-sintetaza. Metanogeni tip posjeduje dvije važne insercije. Jedna je 30-ak aminokiselina duga insercija između motiva 1 i 2 unutar katalitičke domene strukturirana kao zavojnica-okret-zavojnica (engl. *helix-turn-helix fold*), a druga, tzv. «serinska omča» (engl. *serine ordering loop*), smještena je između motiva 2 i 3 i unutar nje se iz neuređene strukture formira zavojnica prilikom vezanja serina. Metanogenom tipu nedostaje dio petlje motiva 2, koji kod klasičnog tipa sudjeluje i u prepoznavanju serina i odgovarajuće molekule tRNA (Cusack i sur., 1996). Postoji razlika i u samoj N-terminalnoj domeni, koja je kod SerRS odgovorna za prepoznavanje i vezanje selektivne varijabilne ruke tRNA. Osim što su kod ova dva tipa N-terminalne domene jako niskog stupnja sličnosti sekvenci, metanogeni tip odstupa i strukturno: strukturnom analizom metanogenog tipa SerRS kod *Methanosarcina barkeri* (MbSerRS) pokazano je da se umjesto očekivane N-terminalne domene antiparalelnih α -zavojnica (engl. *coiled coil*) pojavljuje šesterolančana antiparalelna β -nabrana ploča omeđena četirima zavojnicama (Bilokapić i sur., 2006). Rješavanje strukture otkrilo je i važnu razliku u samom aktivnom mjestu katalitičke domene te pokazalo da je mSerRS zapravo metaloprotein: za katalizu koristi pomoć cinkovog iona koji je u aktivnom mjestu koordiniran trima aminokiselinama sintetaze te jednom molekulom vode. Prilikom vezanja serina, on preuzima koordinacijsko mjesto vode (Bilokapić i sur., 2006, Slika 9.). Zanimljivo je da je mSerRS po svim ovim karakteristikama kojima se razlikuje od klasične SerRS slična treonil-tRNA-sintetazi, što je pokazano poravnanjem sekvenci, rješavanjem 3D-struktura te određivanjem mehanizma vezanja odgovarajuće aminokiseline (primijetimo i da su sam serin i treonin prilično slični).



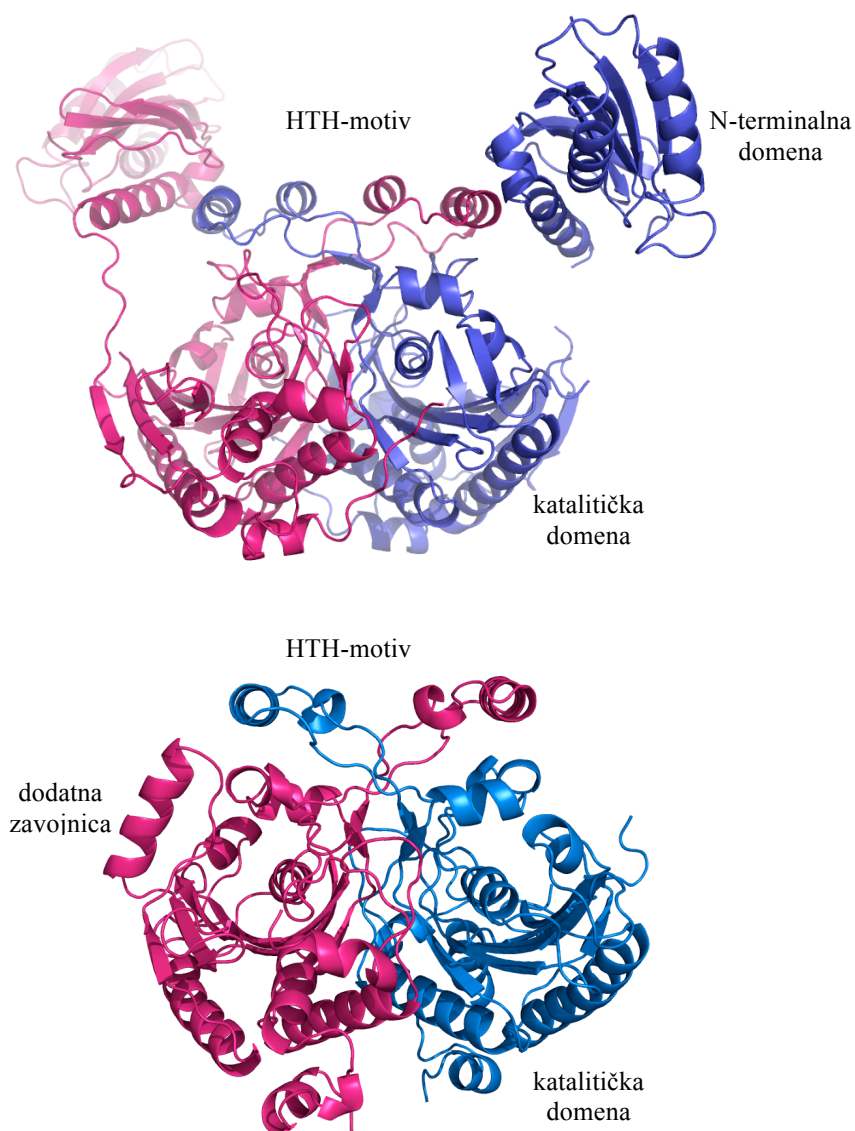
Slika 9. Aktivno mjesto SerRS bakterijskog (lijevo) i metanogenog (desno) tipa s vezanim analogom seril-adenilata; aminokiseline u interakciji sa supstratom istaknute štapićima, cinkov ion obojan svijetlo-plavo (preuzeto iz Bilokapić i sur., 2009)

3.5.1. Biokemijska i strukturalna svojstva paraloga

Već su preliminarna biokemijska istraživanja pretpostavila da su ovi proteini homodimerni homolozi katalitičke podjedinice mSerRS te da sadrže cink. Obzirom na to da im nedostaje N-terminalna tRNA-vezna domena, ne mogu provoditi aminoacilaciju tRNA. Ipak, testirana je mogućnost da negdje u genomu posjeduju *in trans* tRNA-veznu domenu. Konstruirane su genske fuzije N-terminalne domene MbSerRS i svakog od odabranih paraloga (At, Bj1, Bj2) i njihovi produkti nisu aminoacilirali tRNA (Močibob i sur., neobjavljeno), što čini pretpostavku o postojanju *in trans* N-terminalne domene vrlo diskutabilnom. Što se tiče supstrata koje vežu, biokemijske su analize pokazale da paralog At preferentno aktivira alanin, dok je supstrat paraloga Bj1 i Bj2 glicin. At može aktivirati i serin, ali sa znatno slabijim afinitetom, dok ga paralozi Bj uopće ne aktiviraju. Pretpostavilo se vezanje prvo ATP-a, a tek onda aminokiseline u aktivno mjesto (Močibob i sur., neobjavljeno). Ništa se za sada ne zna o konačnom primatelju aktivirane aminokiseline, osim što se zna da to nije tRNA. Također, mehanizam prepoznavanja supstrata još uvijek nije poznat (o njemu se može saznati više analizama ciljanih mutanata, nakon što je točna struktura aktivnog mjesta poznata).

Nakon ekspresije i uspješnog pročišćavanja, paralozi Bj1 i Bj2 poslani su na strukturalnu analizu (Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju, IRB). Uspješno je kristaliziran prvi paralog, Bj1, i dobiveni su preliminarni rezultati riješene

strukture (Ivić i sur., neobjavljeno). Potvrđeno je da se radi o homodimeru koji je homolog katalitičke domene te koji ne posjeduje N-terminalnu tRNA-veznu domenu (Slika 10.). Sama katalitička domena izgrađena je od sedmerolančane β -nabrane ploče okružene α -zavojnica.

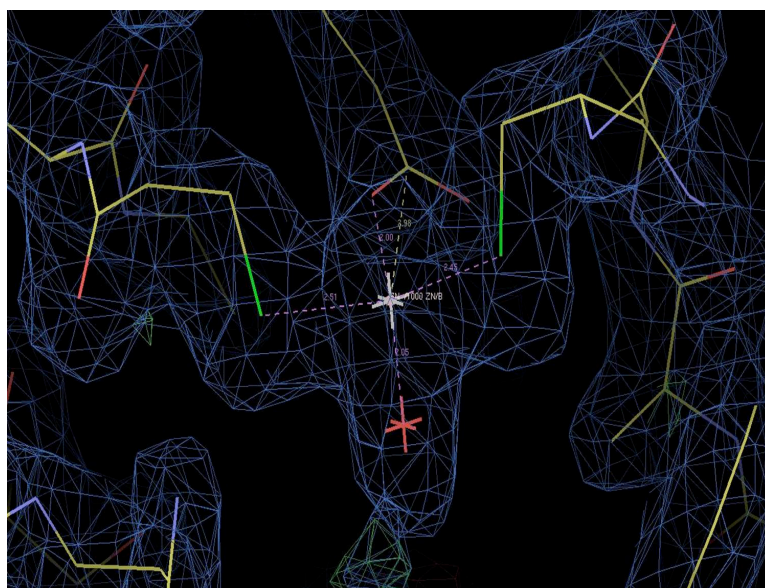


Slika 10. Usporedba struktura mSerRS iz *Methanosarcina barkeri* i paraloga Bj1 iz *Bradyrhizobium japonicum*: Bj1 nema N-terminalnu domenu, unutar HTH-motiva unutrašnja zavojnica je kraća, a kod samo jednog monomera katalitičke domene pojavljuje se dodatna zavojnica (Ivić i sur., neobjavljeno).

Poput svog metanogenog «originala», unutar katalitičke domene Bj1 ima karakterističnu HTH-inserciju. Iako su predviđanja ukazivala na to da bi unutrašnja zavojnica HTH-motiva trebala biti β -nabrana ploča, strukturna analiza pokazala je da se u toj regiji i kod ovog paraloga radi o zavojnici, nešto kraćoj nego kod mSerRS (Slika 10.). Unutar HTH-motiva uočeno je da su bočni ogranci Cys93 svakog od monomera znatno približeni u odnosu na mSerRS; udaljenost sumpora kod paraloga na temelju mape elektronske gustoće procijenjena je na manju od 2Å, dok je kod «originala» međusobna udaljenost istih bočnih ogranaka 4Å. Stoga utemeljeno postoji sumnja da ovdje dolazi do nastanka disulfidne veze koja dodatno pridonosi stabilizaciji i funkcioniranju dimera.

Zanimljivo je da se kod jednog od monomera paraloga unutar katalitičke domene formira dodatna α -zavojnica nalik onoj koja nastaje u regiji «serinske omče» mSerRS prilikom vezanja serina. Ova je zavojnica prisutna kod paraloga i bez vezivanja glicina, a mapa elektronske gustoće pokazuje da se radi isključivo o jednoj dodatnoj zavojnici po dimeru, a ne dvije (Slika 10.).

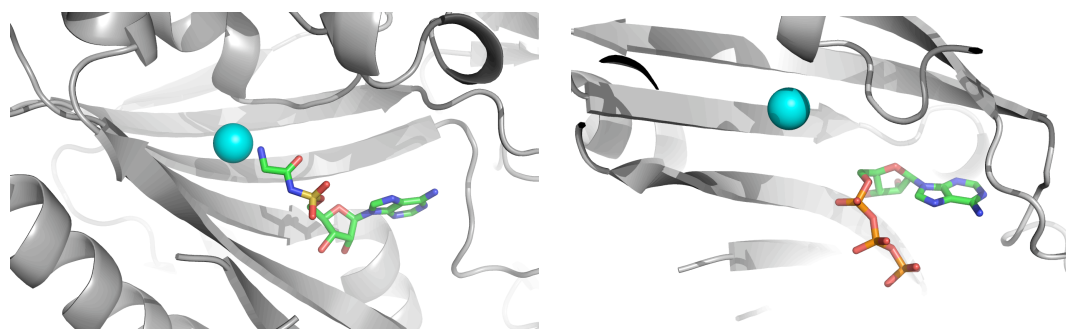
Što se tiče samog aktivnog mjesta, potvrđena je prisutnost iona zinka te njegova gotovo identična koordinacija pomoću dva bočna ogranka cisteina (Cys131, Cys 279), jednog glutamina (Glu176) te jedne molekule vode, koja biva zamijenjena supstratom (Slika 11.).



Slika 11. Mapa elektronske gustoće aktivnog mjesta i koordinacijska sfera iona zinka.

Zeleni bočni ogranci- Cys131, Cys279, ružičasti bočni ogranak- Glu176, crvena struktura- molekula H₂O (Ivić i sur., neobjavljeno).

Utvrđen je i redosljed vezanja supstrata u aktivno mjesto- za aktivaciju glicina, nužno je prethodno vezanje molekule ATP-a. Do tog je zaključka dovela analiza riješenih struktura kristala namakanih različitim supstratima (engl. *soaking*). Kristali su namakani zasebno trima supstratima: glicinom, ATP-om te nehidrolizabilnim analogom produkta reakcije, 5'-O-(N-(L-glicil)-sulfamoil)-adenozinom (Gly-AMS). Kod namakanja kristala ATP-om i Gly-AMS-om, u mapame elektronske gustoće jasno su uočeni ovi supstrati (Slika 12.). Suprotno tome, kod namakanja glicinom, ni na jednoj mapi elektronske gustoće nije uočen glicin vezan u aktivno mjesto. Pretpostavlja se stoga da mu je za aktivaciju potreban prethodno vezan ATP. Način vezanja ATP-a gotovo je identičan onome opisanom za mSerRS (Bilokapić i sur., 2006).



Slika 12. Prikaz aktivnog mjesta paraloga Bj1 s vezanim analogom supstrata Gly-AMS (lijevo) i ATP-om (desno). Glicilna skupina koordinirana je ionom cinka, dok je ATP karakteristično svinut i nije s njim u interakciji (Ivić i sur., neobjavljeno).

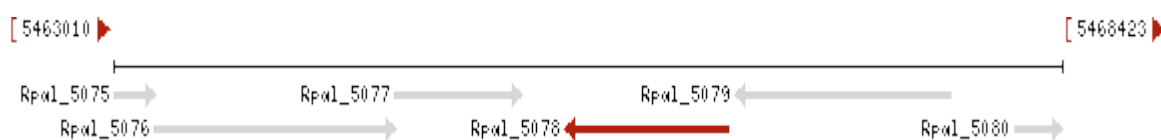
Iako je na temelju homologije očekivana slična struktura paraloga Bj2, o njemu još uvijek ništa ne znamo jer se ni nakon brojnih pokušaja ne uspijeva kristalizirati. Postavljani su najrazličitiji mogući uvjeti kristalizacije te je testirana i mogućnost kristalizacije pomoću klica dobivenog Bj1 (engl. *seeding*), ali zasada neuspješno. Za što uspješnije planiranje daljnjih eksperimenata, napravljeno je predviđanje smanjenja entropije površine (Surface Entropy Reduction prediction, SERp) pomoću internetskog servera za proteinska predviđanja (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SER/>). Ovaj kompjuterski alat identificira aminokiseline pogodne za ciljane mutacije kojima se može povećati vjerojatnost i uspješnost kristalizacije. Obično su to aminokiseline koje nisu evolucijski očuvane niti katalitički važne te su nekakva entropijska «smetnja» izložena na površini proteina. Rezultati su predložili 3 skupine pogodnih mutacija, poredane prema

bodovima predviđenog uspjeha kristalizacije nakon mutacija. Prva skupina, dakle, ona s najvećim bodovima predviđanja, predlaže mutacije dvaju glutaminskih kiselina, E245 i E246, u alanin; druga predlaže mutacije glutamina i lizina, Q229, K230 i Q231; treća predlaže mutacije lizina i glutaminske kiseline, K330 i E331. Idući logičan korak pri pokušajima kristalizacije Bj2 bio bi svakako napraviti prvu predloženu skupinu mutacija na njemu.

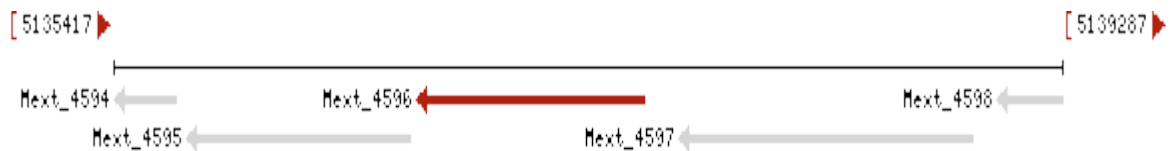
3.5.2. Funkcija paraloga i genomska okolina

Osim što je moguće da ovi paralozi nemaju nikakve veze s biosintezom proteina (dakle, mogu imati neku sasvim drugu funkciju), postoji mogućnost da su ipak uključeni u nastanak proteina, i to putem neribosomske sinteze. Ta sumnja svoje temelje ima u genomskoj okolini detektiranih paraloga. Naime, u genomskoj okolini većine paraloga može se naći gen za protein koji prenosi acilnu skupinu (engl. *acyl carrier protein*, ACP) i/ili gen za protein koji ima fosfopantetein-veznu domenu (engl. *4-phosphopanteteine binding protein*, PBP). Također, paralozi često imaju u svojoj okolini gen za acil-CoA-dehidrogenazu (engl. *acyl-CoA dehydrogenase*, ACAD).

Na slikama 13. i 14. prikazana je genomska okolina proteina notiranih kao Rpal_5078 i Mext_4596, koji su najbliži homolozi paraloga Bj1 iz *Bradyrhizobium japonicum*, a nađeni su kod vrsta *Rhodopseudomonas palustris* i *Methylobacterium extorquens* redom. Možemo primijetiti kako ovi bliski homolozi imaju jako slične genomske okoline. Zanimljivo je da jedan od proteina u genskoj okolini Rpal_5078, notiran kao Rpal_5077, koji je funkcijski dehidrogenaza/reduktaza kratkog lanca (engl. *short-chain dehydrogenase/reductase*, SDR), sadrži domenu za koju se pretpostavlja da veže Rossmanov nabor; dakle, može stvarati interakcije s katalitičkom domenom aaRS. Za neke konkretnije te statistički valjane zaključke o genomskim okolinama paraloga valjalo bi napraviti bioinformatičke analize istih.



Slika 13. Regija genomske okoline potencijalnog paraloga Rpal_5078 kod *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. Notacija: 5075- pretpostavljeni ACP (PBP), 5076- AMP-ovisna sintetaza i ligaza, 5077- dehidrogenaza/reduktaza kratkog lanca- SDR, 5079- acil-CoA-dehidrogenaza, 5080- hipotetski protein (PP-vezna domena) (preuzeto i prilagođeno s <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)



Slika 14. Regija genomske okoline potencijalnog paraloga Mext_4596 kod *Methylobacterium extorquens* PA1. Notacija: 4594- pretpostavljeni ACP (PBP), 4595- alfa/beta-hidrolaza (domena esteraze/lipaze), 4597- acil-CoA-dehidrogenaza, 4598- hipotetski protein (PP-vezna domena) (preuzeto i prilagođeno s <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

4. ZAKLJUČAK I RASPRAVA

Intenzivna istraživanja, što eksperimentalna što teoretska, u proteklj polovici stoljeća postavila su temelje za brojne teorije i prilično detaljne spekulacije o razvoju aminoacil-tRNA-sintetaza i njihovih homologa. Smatra se da su upravo aaRS jedni od najranijih proteina nastali pri samom prijelazu iz svijeta RNA u proteinski svijet, ali njihova evolucija od tog trenutka je sve osim jednostavna i pravocrtna. Ono što se danas može znati sa sigurnošću jest da su se tijekom te evolucije nebrojeno puta dogodili horizontalni prijenosi gena te genske duplikacije koje su dovele do današnje raznolikosti. Postalo je jasno da čuvena hipoteza adaptora ne može biti potpuno ispravna, obzirom na to da neki organizmi imaju manje aaRS nego što postoji aminokiselina, dok ih drugi imaju i u dupliciranim oblicima.

Na temelju ovog kratkog pregleda pronađenih paraloga možemo zaključiti kako su njihove funkcije zaista šarolike te kako je moguće da nije jedan jedini evolucijski put/mehanizam vodio do svih. Neki su od njih zadržali funkciju u biosintezi proteina i time i nisu pravi paralozi. Neki su pak od trenutka duplikacije i selidbe u drugi organizam/dругu okolinu adaptivnom specijacijom osigurali sebi opstanak i postali pravi paralozi, stječući nove funkcije. Neki su homologni svojim originalima u velikoj mjeri, i to u glavnim domenama, dok neki pokazuju samo manji stupanj homologije na manjim domenama, kao da su nekakvi ostaci dupliciranog gena čiji je glavni dio ili pobjegao drugdje ili se nije iz nekog razloga održao.

Cijela ova priča podsjeća me na jedan nedavno pročitani nevjerojatno inspirirajući revijalni članak koji govori o evoluciji regulacijskih mreža putem transponirajućih elemenata genoma (Feschotte, 2008). Možda se isprve doima da nema sličnosti između ove dvije teme, ali s evolucijskog stajališta itekako vidim

poveznicu. U svom revijalnom radu Feschotte objašnjava kako su brojni transkripcijski faktori, DNA-vezni proteini te regulatorni elementi potekli od transpozona koji bi se jednostavno ugradili u različite genomske okoline te stekli mutacije koje bi im priskrbile potencijalno nove funkcije. Ukoliko bi te funkcije bile povoljne u danoj genomskoj okolini (užoj ili široj), nastali bi sasvim novi proteini novih funkcija, koje bi stanica udomaćila i nastavila ih koristiti, gubeći transpozicijsku aktivnost. Zbog njihove duboke evolucijske starosti ne može se odrediti filogenetski je li prije postojala kokoš ili jaje, tj. ne može se reći jesu li novi proteini nastajali nakon transpozicije adaptacijom ili su oni već «postojali unutar transpozona», ali se njihova funkcija mogla ispoljiti tek u drukčijoj genomskoj okolini (a moguće da se događalo i oboje). Unatoč nepovezanosti tema, nemoguće je ne primjetiti analogiju ove evolucijske priče s onim što se vjerojatno događalo aminoacil-tRNA-sintetazama i njihovim homolozima tijekom transfera i duplikacija.

Iako su se analize genoma pokazale korisnima za preliminarne detekcije paraloga te za analize njihovih filogenetskih odnosa, smatram da bi priličan broj paraloga mogao biti otkriven i analiziran na temelju strukturalne homologije, koja se pokazala u puno većoj mjeri očuvana od homologije sekvenci. Isto tako, strukturalne filogenetske analize ne smiju biti zanemarene jer one nužno nadopunjuju filogeniju na temelju sekvenci. Sekvence mogu nekada davati jako malo podataka ili zamesti evolucijski trag u slučaju ovako drevnih proteina, koji su prošli brojne insercije, delecije i mutacije tijekom svoje prošlosti. Ipak, struktura ili makar dijelovi strukture (npr. samo aktivno mjesto) mogu biti dobro očuvani i govoriti nam o prošlosti i srodnosti promatranih proteina.

Kao i za svaki kvalitetan rad moderne znanosti, za detaljnije buduće istraživanje paraloga aminoacil-tRNA-sintetaza, njihovih funkcija, struktura, biokemijskih i fizioloških svojstava te evolucije bit će ključna suradnja stručnjaka iz različitih teoretskih i eksperimentalnih područja, od bioinformatike i filogenije do biokemije i biofizike.

5. LITERATURA

- Crick, F. H. C. (1958) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12, 138–163
- Stathopoulos, C., Ahel, I., Ali, K., Ambrogelly, A., Becker, H., Bunjun, S., Feng, L., Herring, S., Jacquín-Becker, C., Kobayashi, H. i sur. (2001) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 66, 175–183
- Schimmel, P. & Ribas De Pouplana, L. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25, 207–209
- Woese, C. R., Olsen, G. J., Ibba, M., Soll, D. (2000) *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 64, 202-236
- Kao, J., Fan, Y. G., Haehnel, I., Brett, J., Greenberg, S., Clauss, M., Kayton, M., Houck, K., Kisiel, W., Seljelid, R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 25106–25119
- Kleeman, T. A., Wei, D., Simpson, K. L., First, E. A. i sur. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 14420–14425
- Wakasugi, K., Schimmel, P. (1999) *Science* 284, 147–151
- Swairjo M. A., Morales, A. J., Wang, C. C., Ortiz, A. R., Schimmel, P. (2000) *EMBO J.* 19, 6287-6298
- Kushiro, T., Schimmel, P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16631–16635
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M., Hurt, E. C. (1996) *EMBO J.* 15, 5437-5448
- Simader, H., Hothorn, M., Kohler, C., Basquin, J., Simos, G., Suck (2006) *Nucleic Acids Research* 34, 3968–3979
- Fukunaga, R., Yokoyama, S. (2007) *Acta Crystallogr.* 63, 390-400
- Carrodeguas, J. A., Kobayashi, R., Lim, S. E., Copeland, W. C., Bogenhagen, D. F. (1999) *Mol. And Cell. Biol.* 19, 4039–4046
- Fan, L., Sanschagrin, P. C., Kaguni, L. S., Kuhn, L. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9527–9532
- Salazar, J. C., Ambrogelly, A., Crain, P. F., McCloskey, J. A., Soll, D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7536–7541
- Lamour, V., Quevillon, S., Diriong, S., N'Guyen, V. C., Lipinski, M., Mirande, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8670–8674

- Liu, J., Lin, S. X., Blochet, J. E., Pézolet, M., Lapointe, J. (1993) *Biochemistry* 32, 11390–11396
- Sissler, M., Delorme, C., Bond, J., Ehrlich, S. D., Renault, P., Francklyn, C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8985–8990
- Vega, C. M., Zou, P., Fernandez, F. J., Murphy, G. E., Sterner, R., Popov, A., Wilmanns, M. (2005) *Mol. Microbiol.* 55, 675–686
- Roy, H., Becker, H. D., Reinbolt, J., Kern, D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9837–9842
- Nakatsu, T., Kato, H., Oda, J. (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5, 15–19
- Cusack, S., Yaremchuk, A., Tukalo, M. (1996) *EMBO J.* 15, 2834–2842
- Bilokapić, S., Maier, T., Ahel, D., Gruić-Sovulj, I., Soll, D., Weygand-Đurašević, I., Ban, N. (2006) *EMBO J.* 25, 2498–2509
- Bilokapić, S., Ban, N., Weygand-Đurašević, I. (2009) *Croatica Chemica Acta* 82, 51–59
- Feschotte, C. (2008) *Nature Reviews- Genetics* 9, 397–405
- <http://www.scripps.edu/news/sk/sk2004/sk04schimmel.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SER/>

6. SAŽETAK

Aminoacil-tRNA-sintetaze ključni su enzimi u biosintetskom putu proteina i jedni od evolucijski najstarijih enzima. Analizama njima homolognih genskih sekvenci i proteinskih struktura utvrđeno je postojanje cijelog spektra tzv. krnjih paraloga, koji su funkcionalno uglavnom divergirali od svojih originala u više različitih smjerova.

Ovim radom napravljen je osvrt na gotovo sve skupine otkrivenih paraloga te je izložena i komentirana funkcija, struktura i evolucija najzanimljivijih od njih. Paralozi su svrstani prema svojstvu homologije koju nose u dvije veće skupine, ovisno o tome sadrže li sekvencu homolognu katalitičkoj domeni odgovarajuće aaRS ili ne. Poseban je naglasak stavljen na nedavno otkrivene paraloge specifičnog metanogenog tipa seril-tRNA-sintetaza, čije su detaljne biokemijske i strukturalne analize upravo u tijeku.

7. SUMMARY

Aminoacyl-tRNA synthetases are one of the key enzymes in protein biosynthesis and one of the evolutionary oldest enzymes as well. By analyses of their homologic sequences and protein structures, the existence of a wide spectrum of so-called truncated paralogs, which have mostly functionally diverged from their originals into several different new pathways, has been shown.

In this work a critical review of almost all groups of determined paralogs has been made. Also, function, structure and evolution of the most interesting ones has been established and commented. Paralogs have been divided into two larger subgroups based on their homology characteristics, depending on the homologous catalytic domain possession. A special emphasis has been put on recently discovered methanogenic seryl-tRNA synthetases paralogs, whose detailed biochemical and structural analyses have just been in progress.

8. ZAHVALE

Najljepše zahvaljujem prof. dr. sc. Ivani Weygand-Đurašević na stručnom vodstvu te korisnim i konstruktivnim savjetima.

Veliko hvala dr. sc. Mariji Luić na ugodnom gostoprimstvu u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Instituta Ruđer Bošković te njenoj suradnici Nives Ivić na poticajnim razgovorima, svemu praktičnom naučenom te nadasve prijateljskom odnosu.