

Mehanizmi enzimske selektivnosti

Keresteš, Gaj

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:661190>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Gaj Keresteš

Mehanizmi enzimske selektivnosti

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Gaj Keresteš

Mechanisms of enzyme selectivity

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić-Sovulj.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Mehanizmi enzimske selektivnosti

Gaj Keresteš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Enzimi su biološke makromolekule koje efikasno i selektivno kataliziraju specifične reakcije. Selektivnost enzima se temelji na uspostavljanju specifičnih pozitivnih interakcija s pripadnim supstratima i negativnih interakcija s nepripadnim supstratima u njihovom osnovnom ili prijelaznom stanju. Porodica kimotripsinskih serinskih proteaza obuhvaća enzime koji imaju vrlo različite razine selektivnosti. Za razliku od njih, aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji različitim mehanizmima postižu izrazito visoke razine selektivnosti – u sintetskoj reakciji njihova selektivnost doseže fizikalno-kemijske granice, a kasnije se dodatno povećava mehanizmima popravka pogreške. Tijekom evolucije većina enzima prati trend sužavanja supstratne specifičnosti i povećanja selektivnosti, pri čemu selektivnost može biti selektirana izravno ili se razviti kao posljedica optimizacije katalitičke efikasnosti. Evolucija aaRS prati ovaj trend te je aktivno utjecala na razvoj suvremenog genetičkog koda.

Ključne riječi: aminoacil-tRNA-sintetaze, serinske proteaze, enzimska specifičnost, popravak pogreške, evolucija enzima

(32 stranice, 7 slika, 2 tablice, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Mechanisms of enzyme selectivity

Gaj Keresteš

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Enzymes are biological macromolecules that efficiently and selectively catalyze specific reactions. Enzyme selectivity is based on establishing specific positive interactions with cognate substrates and negative interactions with noncognate substrates in their ground or transition states. The chymotrypsin family of serine proteases includes enzymes with very different levels of selectivity. Conversely, aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes which, through various mechanisms, achieve extremely high levels of selectivity – their selectivity in the synthetic reaction reaches physicochemical limits and is later additionally increased by proofreading. Throughout evolution, most enzymes followed the trend of narrowing substrate specificity and increasing selectivity. Selectivity can be directly selected for or developed as a consequence of optimizing catalytic efficiency. The evolution of aaRS follows this trend and actively influenced the development of the contemporary genetic code.

Keywords: aminoacyl-tRNA-synthetases, serine proteases, enzyme specificity, editing, enzyme evolution

(32 pages, 7 figures, 2 tables, 45 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Popis kratica

RNA – ribonukleinska kiselina, *eng. ribonucleic acid*

tRNA – transfer RNA

aaRS – aminoacil-tRNA-sintetaza

AA – aminokiselina

AMP – adenzin-monofosfat

ATP – adenzin-trifosfat

AA-AMP – aminoacil-adenilat

Gly – glicin

Ala – alanin

Val – valin

Leu – leucin

Ile – izoleucin

Ser – serin

Thr – treonin

Asp – aspartat

Glu – glutamat

Asn – asparagin

Gln – glutamin

Pro – prolin

Phe – fenilalanin

Tyr – tirozin

Trp – triptofan

Lys – lizin

Arg – arginin

His – histidin

Cys – cistein

Met – metionin

β -HNV – β -hidroksinorvalin

K_M – Michaelisova konstanta, odgovara koncentraciji supstrata pri kojoj je brzina reakcije (V_0) jednaka $\frac{1}{2}$ maksimalne brzine reakcije (V_{max})

k_{cat} – obrtni broj, odgovara broju molekula supstrata koju jedno aktivno mjesto enzima

može pretvoriti u produkt u jedinici vremena kad je enzim u potpunosti zasićen supstratom

D – faktor diskriminacije,

$$D = \frac{(k_{cat}/K_M)_{pripadni\ supstrat}}{(k_{cat}/K_M)_{nepripadni\ supstrat}}$$

CP1, CP2 – povezujući peptid 1 i 2, *eng. connecting peptide 1, connecting peptide 2*

ES – kompleks enzima i supstrata

EX – kompleks enzima i prijelaznog stanja

E_a – energija aktivacije

Pn – AA polipeptidnog supstrata serinske proteaze, n-ta po redu od veze koja se cijepa prema C-terminalnom kraju enzima, *eng. peptide substrate*

Pn' – AA polipeptidnog supstrata serinske proteaze, n-ta po redu od veze koja se cijepa prema N-terminalnom kraju enzima, *eng. peptide substrate*

Sn – poddžep serinske proteaze koji stupa u interakciju s Pn, *eng. subpocket*

Sn' – poddžep serinske proteaze koji stupa u interakciju s Pn', *eng. subpocket*

L1, L2 – površinske omče, *eng. loop 1, loop 2*

Tr→Ch – tripsin mutiran da ima kimotripsinsku specifičnost

C3bB – kompleks komponente komplemента C3b (nastalog cijepanjem komponente C3 na C3a i C3b) i faktora B

pNA – *p*-nitroanilid

HIGH – motiv unutar HUP domene sa strukturom Rossmanovog tipa očuvane sekvence His-Ile-Gly-His

KMSKS – motiv unutar HUP domene sa strukturom Rossmanovog tipa očuvane sekvence Lys-Met-Ser-Lys-Ser

INS – domena ProRS umetnuta između motiva 2 i 3, *eng. insertion*

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OSNOVNI MEHANIZMI SELEKTIVNOSTI	3
2.1. Pozitivne interakcije.....	3
2.2. Negativne interakcije	5
2.3. Paradoks hidroksilne skupine	6
3. SUPSTRATNA I KATALITIČKA DISKRIMINACIJA – UTJECAJ NA KATALITIČKU EFIKASNOST	7
4. PREPOZNAVANJE I POZICIONIRANJE SUPSTRATA U SERINSKIM PROTEAZAMA I AARS 9	
4.1. Prepoznavanje i pozicioniranje supstrata u serinskim proteazama	9
4.1.1. Tripsin, kimotripsin i elastaza	10
4.1.2. Faktor D, α -litička proteaza i uloge konformacijske promjene	13
4.2. Prepoznavanje i pozicioniranje AA u aaRS.....	14
4.2.1. AaRS razreda I	16
4.2.2. AaRS razreda II.....	17
5. MEHANIZMI POPRAVKA POGREŠKE AARS	18
5.1. Popravak pogreške poslije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA.....	19
5.2. Popravak pogreške prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA	20
5.3. Samostojeći proteini za hidrolizu AA-tRNA	21
6. RAZVOJ SELEKTIVNOSTI.....	21
6.1. Evolucija aaRS.....	24
7. ZAKLJUČAK	26
8. Literatura	27
9. Životopis.....	32

1. UVOD

Enzimi su biološki katalizatori. U velikoj većini slučajeva je riječ o proteinima, ali postoje i katalitičke molekule RNA. Aktivnost enzima je nezamjenjiva za sve poznate oblike života. Brzina većine nekataliziranih reakcija u fiziološkim uvjetima – neutralni pH, relativno niske temperature, vodeno okruženje – nije dovoljna za održavanje života. Stanice ovise o enzimima za katalizu gotovo svih biokemijskih procesa, uključujući dobivanje energije, sintezu makromolekula, detoksifikaciju, prijenos signala i mnoge druge. Katalitičke sposobnosti enzima su goleme, do nekoliko redova veličine veće u usporedbi s kemijskim katalizatorima. Enzimi su također, za razliku od kemijskih katalizatora, u principu specifični u katalizi točno određenih reakcija na točno određenim supstratima te postoje puno veće mogućnosti regulacije njihove aktivnosti ovisno o potrebama organizma. Praktične primjene spoznaja o enzimima su mnogobrojne – od mogućnosti dijagnoze bolesti, razvoja antibiotika i drugih lijekova, do primjene enzima kao alata u istraživanjima i industriji (Voet i Voet 2010; Nelson i Cox 2012; Berg i sur. 2015).

Korištenje pojmova specifičnost i selektivnost u literaturi o enzimima nije u potpunosti usklađeno (Fersht 1985; Hedstrom 2002; Perona i sur. 1995; Peracchi 2018; Gomez i Ibba 2020, Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). Zbog veće jasnoće teksta, u ovom radu se ti pojmovi koriste za obilježavanje dva povezana, ali različita svojstva enzima. Specifičnost označava sposobnost enzima da veže pripadni supstrat, odnosno pripadne supstrate, i efikasno katalizira njihovu pretvorbu u određene produkte. Ona ovisi o specifičnim interakcijama koje enzim uspostavlja s osnovnim i prijelaznim stanjem pripadnog supstrata (Voet i Voet 2010; Nelson i Cox 2012; Berg i sur. 2015), a kinetički se može opisati kao konstanta specifičnosti k_{cat}/K_M za pripadne supstrate enzima. Selektivnost označava mogućnost enzima da diskriminira različite potencijalne supstrate – najznačajnije, da diskriminira pripadne i nepripadne supstrate. Može se postići zbog razlike u interakcijama koje enzim uspostavlja s pripadnim i nepripadnim supstratima ili njihovim prijelaznim stanjima (Tawfik 2014), a kinetički se može opisati faktorom diskriminacije, $D = \frac{(k_{cat}/K_M)_{pripadni\ supstrat}}{(k_{cat}/K_M)_{nepripadni\ supstrat}}$. Među različitim enzimima, specifičnost i selektivnost mogu jako varirati ovisno o njihovoj funkciji (Hedstrom 2002; Voet i Voet 2010; Berg i sur. 2015).

Serinske proteaze su među prvim enzimima koji su detaljno istraženi te zbog toga predstavljaju temelj razumijevanja mehanizama enzimske katalize i prepoznavanja supstrata

(Perona i Craik 1995; Ma i sur. 2005). Proteaze su enzimi koji kataliziraju hidrolitičko cijepanje peptidnih veza, a u serinskim proteazama je za mehanizam te reakcije ključna takozvana katalitička trijada, odnosno bočni ogranci Ser, His i Asp u aktivnom mjestu enzima. Serinske proteaze obuhvaćaju porodice kimotripsinskih, suptilizinskih, karboksipeptidaza Y i Clp proteaza. Kimotripsinske serinske proteaze sudjeluju u širokom rasponu fizioloških procesa uključujući probavu, hemostazu i imunski odgovor. Specifičnost i selektivnost različitih enzima iz ove porodice se može jako razlikovati ovisno o njihovoj funkciji. Specifičnost probavnih proteaza je obično relativno široka jer im je zadatak razgraditi velik broj različitih supstrata, dok su proteaze uključene u imunski odgovor i hemostazu često izrazito specifične i imaju visoku razinu selektivnosti (Hedstrom 2002; Waldner i sur. 2018; Berg i sur. 2015).

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji omogućuju čitanje genetičkog koda povezivanjem molekula tRNA s odgovarajućim AA. Ta reakcija se odvija u dva koraka. AA se prvo aktivira reakcijom s ATP-om pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (AA-AMP). U drugom koraku dolazi do prijenosa aminoacilne skupine na tRNA. AaRS se dijele u dva razreda koja su evolucijski odvojena i imaju karakterističnu građu aktivnih mjesta. Imaju izrazito visoku specifičnost (Guo i Schimmel 2012; Gomez i Ibba 2020) – svaka aaRS povezuje samo jednu AA s pripadnim tRNA – te, za razliku od mnogih ostalih enzima (Peracchi 2018), uspostavljaju maksimalni broj specifičnih interakcija sa supstratima, što im omogućuje iznadprosječne razine selektivnosti. Smanjena selektivnost aaRS rezultira povećanjem stope pogrešaka u translaciji (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020), što je u bakterijama letalno, a u sisavcima uzrokuje neurodegenerativne bolesti (Martinis i Boniecki 2010; Perona i Gruić-Sovulj 2013). Diskriminacija AA je posebno zahtjevna jer se te molekule razlikuju samo po bočnom lancu, tako da je broj specifičnih interakcija koje se s njima mogu uspostaviti jako ograničen (Iverson 2016; Gomez i Ibba 2020). Stroga i teško postignuta selektivnost, kao i dobro definirani nepripadni supstrati, mjerljivi utjecaji na fitnes i širok raspon kemijskih svojstava bočnih ogranaka AA čine interakcije aaRS i AA pogodnima za istraživanje mehanizama enzimske selektivnosti (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

2. OSNOVNI MEHANIZMI SELEKTIVNOSTI

2.1. Pozitivne interakcije

Enzimaska selektivnost se temelji na razlikama u interakcijama koje enzim uspostavlja s pripadnim supstratima i interakcijama koje uspostavlja s nepripadnim supstratima. Odnosno, diskriminacija supstrata se može postići uspostavljanjem pozitivnih interakcija (vodikove veze, elektrostatsko privlačenje, van der Waalove sile) s pripadnim supstratima i uspostavljanjem negativnih interakcija (sterička i elektrostatska odbijanja) s nepripadnim supstratima (Tawfik 2014).

Specifične van der Waalove interakcije koje enzim uspostavlja s pripadnim supstratom, te izostanak tih interakcija s nepripadnim supstratima, omogućuju relativno slabu selektivnost. Na primjer, nepripadne supstrate koji su za jednu metilensku skupinu manji od pripadne aminokiseline, aaRS diskriminiraju faktorima od 100 do 300, uz iznimku ThrRS koji diskriminira Ser faktorom 1067. Veća selektivnost ThrRS u odnosu na ostale aaRS se možda ostvaruje modulacijom interakcija sa supstratima pomoću iona cinka u aktivnom mjestu. Glavna uloga cinka u ThrRS je diskriminacija Val, ali mogao bi doprinosti i diskriminaciji Ser tako da s njim ostvaruje manje povoljne interakcije nego s Thr. Većim brojem van der Waalovih interakcija s pripadnim supstratom, odnosno gubitkom tih interakcija s nepripadnim supstratom, može se postići viša razina selektivnosti. AaRS mogu adekvatno diskriminirati nepripadne aminokiseline koje su za dvije metilenske skupine manje od pripadne (na primjer diskriminacija Ala od strane ValRS), pri čemu je prosječni faktor diskriminacije po metilenskoj skupini oko 87. Značajno je da je energija van der Waalovih interakcija aaRS s metilenskim skupinama AA dvostruko veća od prosječne energije sličnih interakcija u drugim proteinima, što aaRS omogućuje višu razinu selektivnosti. Konkretno, prosječni faktor diskriminacije supstrata koji su za jednu metilensku skupinu manji od pripadnog je 49 puta veći u aaRS nego u ostalim enzimima kojima su supstrati AA (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

Polarne interakcije su važne za vezanje i pravilno pozicioniranje pripadnih supstrata u aktivnom mjestu enzima. Jače su od van der Waalovih interakcija, što omogućuje bolju diskriminaciju nepripadnih supstrata kojima nedostaje polarna skupina prisutna u pripadnom supstratu. AaRS adekvatno diskriminiraju AA koje su za jednu hidroksilnu skupinu manje od pripadne, u prosjeku faktorom 8×10^4 . Vodikove veze između enzima i pripadnog supstrata mogu

u većoj mjeri doprinijeti selektivnosti ako je donor vodikove veze nabijena aminokiselina – pri vezanju supstrata kojem nedostaje recipijent veze će u aktivnom mjestu ostati neuparen pozitivan naboj. Tu ulogu kod nekih aaRS ima očuvani Asp u sintetskom mjestu. AaRS također mogu efikasno razlikovati hidroksilnu skupinu pripadnog supstrata od izosteričnih skupina u nepripadnim supstratima. SerRS efikasno (faktorom $3,4 \times 10^3$) razlikuje cistein od serina zahvaljujući manjoj polarnosti, manjem kapacitetu stvaranja vodikovih veza i većoj veličini tiolatne skupine u odnosu na hidroksilnu. Hidroksilna skupina u pripadnom supstratu i drugim enzimima pruža veće mogućnosti diskriminacije nepripadnih supstrata, ali u značajno manjoj mjeri nego aaRS. Prosječan faktor diskriminacije supstrata koji su za jednu hidroksilnu skupinu manju od pripadnog je $2,4 \times 10^3$ puta veći kod aaRS nego kod ostalih enzima kojima su supstrati AA (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

Van der Waalove i interakcije i vodikove veze ovise o preciznoj konformaciji molekula, zbog čega njihovo uspostavljanje značajno ovisi o komplementarnosti enzima i supstrata. Za razliku od toga, elektrostatske interakcije zbog svog daljeg dosega, i kontinuirane ovisnosti jačine o udaljenosti između molekula, manje ovise o preciznoj konformaciji mjesta za prepoznavanje supstrata. Fleksibilnost mjesta za prepoznavanje supstrata, koja inače uzrokuje širu specifičnost i nižu selektivnost enzima, manje utječe na elektrostatske interakcije u usporedbi s van der Waalovim i polarnim interakcijama (Waldner i sur. 2018). Elektrostatske interakcije omogućuju još veću selektivnost aaRS od polarnih interakcija (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). Mjesto vezanja AA u GluRS sadrži bočne ogranke dva Arg koji uspostavljaju specifične elektrostatske interakcije s Glu i omogućuju produktivno vezanje isključivo te AA. Zanimljivo je da su pozitivne elektrostatske interakcije Glu i Arg iskorištene i za diskriminaciju Glu u GlnRS – u ovom slučaju iste interakcije uzrokuju neproduktivno vezanje nepripadnog Glu (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). Elektrostatske interakcije omogućuju visoku selektivnost i tripsina, što se odražava i kroz smanjenje K_M vrijednosti za pripadne supstrate koji imaju Arg ili Lys uz peptidnu vezu koja se cijepa izravno zbog elektrostatskog privlačenja, i kroz povećanje k_{cat} za te supstrate tako što elektrostatska interakcija Arg ili Lys s očuvanim Asp u veznom mjestu mijenja konformaciju Gly216 što je nužno za produktivno pozicioniranje peptidne veze za hidrolizu (Perona i sur. 1995).

2.2. Negativne interakcije

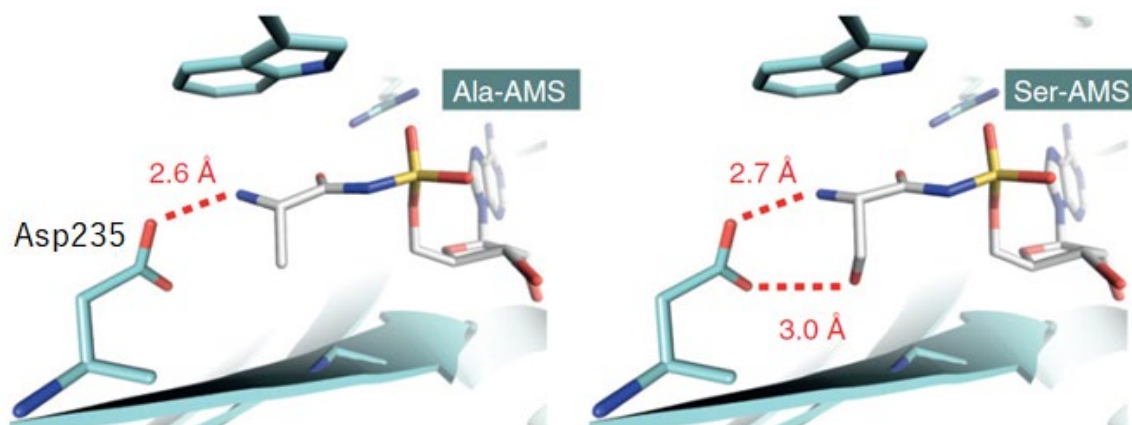
AaRS efikasno diskriminiraju hidrofobne nepripadne AA koje su veće ili drugačije razgranate od pripadne AA. Na primjer, Ile je za jednu metilensku skupinu veći od Val, a jednako je velik kao i drugačije razgranati Leu. ValRS u koraku aktivacije diskriminira Ile faktorom $7,4 \times 10^4$, dok LeuRS diskriminira Ile faktorom $3,1 \times 10^4$. Mehanizam navedene diskriminacije obuhvaća steričke smetnje na koje takve nepripadne AA nailaze u veznom mjestu, a koje čine vezanje i aktivaciju izuzetno energetski nepovoljnima (Siddiq i sur. 2018, Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). Steričke smetnje mogu značajno doprinijeti i diskriminaciji manjih AA koje su razgranate na mjestu na kojem pripadna AA nije – LeuRS diskriminira Val faktorom $3,2 \times 10^3$. (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). Aktivno mjesto elastaza, za razliku od aaRS, nije specifično za samo određenu AA, već za sve manje hidrofobne AA. Zbog toga je razumljivo da ljudska granulocitna elastaza diskriminira Ile u odnosu na Val faktorom 5 (Zimmerman i Ashe 1977), a elastaza iz svinjske gušterače diskriminira Ile u odnosu na Leu faktorom 4,5 (Harper i sur. 1984). Međutim, i enzimi kojima supstrat jest određena AA, prema AA koje su za jednu metilensku skupinu veće od pripadne imaju faktor diskriminacije u prosjeku > 500 puta manji od onog prisutnog u aaRS. Niža selektivnost prema AA većoj za jednu metilensku skupinu je prisutna i kod aaRS u nekim slučajevima – ThrRS diskriminira β -hidroksinorvalin (β -HNV) faktorom 29. HNV, za razliku od ostalih AA uspoređenih u ovom odlomku, nije prisutan u stanicama u normalnim uvjetima (Minajigi i sur. 2011), tako da nije stvarao selekcijski pritisak na ThrRS da razvije metode diskriminacije. Ovaj primjer ukazuje na to da je selektivnost aaRS eksplicitno selektirana s obzirom na fiziološki relevantne nepripadne supstrate (Minajigi i sur. 2011; Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

Elektrostatsko odbijanje također služi enzimima u diskriminaciji nepripadnih supstrata (Tawfik 2014; Peracchi 2018). Podaci o diskriminaciji supstrata s nabojem suprotnim od naboja pripadnog supstrata (primjerice za diskriminaciju Glu od strane ArgRS) nisu dostupni ni za aaRS ni za tripsin. Moguć razlog ovog je velik domet elektrostatskih interakcija koji vjerojatno gotovo u potpunosti sprječava vezanje i pretvorbu ovakvih nepripadnih supstrata. Izrazito slab afinitet enzima prema određenim nepripadnim supstratima otežava mjerenja te može onemogućiti kvantitativnu analizu.

2.3. Paradoks hidroksilne skupine

Dok dodatna metilenska skupina u neprikladnom supstratu pruža mogućnost diskriminacije na temelju steričkih smetnji, diskriminacija neprikladnih supstrata s dodatnom hidroksilnom skupinom je ograničena. Konkretno, prosječni faktor diskriminacije neprikladnog supstrata s dodatnom hidroksilnom skupinom je 560 u usporedbi s faktorom $1,9 \times 10^4$ za dodatnu metilensku skupinu. Ovaj problem je već naveden na primjeru AlaRS koji pri aktivaciji diskriminira Ser samo faktorom 500, a s njim se suočava i PheRS koja diskriminira Tyr također nedovoljnim faktorima 120-2600. Hidroksilna skupina je nešto manja od metilenske pa nailazi na manje steričkih smetnji, ali glavni uzrok ove ograničene mogućnosti diskriminacije je polarnost hidroksilne skupine. Aktivno mjesto i mjesto vezanja AA u aaRS imaju velik broj polarnih i nabijenih AA koje su nužne za vezanje i aktivaciju prikladnih supstrata, a i proteinska okosnica je sama po sebi polarna – sve ove funkcionalne skupine stvaraju mogućnost promiskuitetnog vezanja hidroksilne skupine vodikovim vezama. Adekvatna selektivnost AlaRS i PheRS je postignuta dodatkom domene za popravak pogreške koja, u slučaju oba enzima, specifično prepoznaje hidroksilnu skupinu pogrešno aminoaciliranih Ser i Tyr te hidrolizira nastale Ser-tRNA^{Ala} i Tyr-tRNA^{Phe} (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

Prikaz interakcija AlaRS s analogima Ala-AMP i Ser-AMP se nalaze na Slici 1. Naznačene su vodikove veze koje karboksilni kisik očuvanog Asp uspostavlja s α -amino skupinama Ala i Ser te dodatna vodikova veza koju drugi karboksilni kisik Asp uspostavlja s hidroksilnom skupinom Ser. Ta dodatna vodikova veza koju Ser uspostavlja s AlaRS mu omogućuje čvršće vezanje i smanjuje faktor diskriminacije u odnosu na Ala. U nekim PheRS, očuvani Ala u veznom mjestu stvara steričke smetnje za hidroksilnu skupinu Tyr. Međutim, karbonilni kisik tog Ala uspostavlja vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom Tyr, što smanjuje njegov doprinos selektivnosti (Guo i Schimmel 2012).



Slika 1. Interakcije sintetskog aktivnog mjesta AlaRS s Ala-AMS (alanil-adenilat sulfamoil, analog Ala-AMP) i Ser-AMS (seril-adenilat sulfamoil, analog Ser-AMP). Bočni ogranak Trp uspostavlja interakcije s okosnicom supstrata. Vodikove veze koje Asp235 uspostavlja s α -amino skupinama supstrata i hidroksilnom skupinom Ser-AMS su prikazane isprekidanim crvenim linijama. Preuzeto i prilagođeno prema Guo i Schimmel 2012.

AaRS koja uspješno diskriminira strukturno sličnu AA s hidroksilnom skupinom je CysRS. Cys na β -C atom ima vezanu tiolatnu skupinu koja uspostavlja direktnu interakciju s ionom cinka u veznom mjestu, koji ima veći afinitet prema tiolatnoj nego prema hidroksilnoj skupini – zbog ovog CysRS može diskriminirati Ser faktorom $1,1 \times 10^8$ unatoč tome što je Ser polarniji i može uspostavljati čvršće vodikove veze (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

Paradoks hidroksilne skupine nije univerzalan među svim enzimima. Naprotiv, diskriminacija supstrata koji su za jednu hidroksilnu skupinu veći od pripadnog je uspješnija u drugim enzimima u odnosu na aaRS, i to oko 20 puta za druge enzime kojima su supstrati AA. Visoka razina diskriminacije supstrata s dodatnom hidroksilnom skupinom se može postići steričkim smetnjama i formiranjem veznog mjesta bez polarnih skupina (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

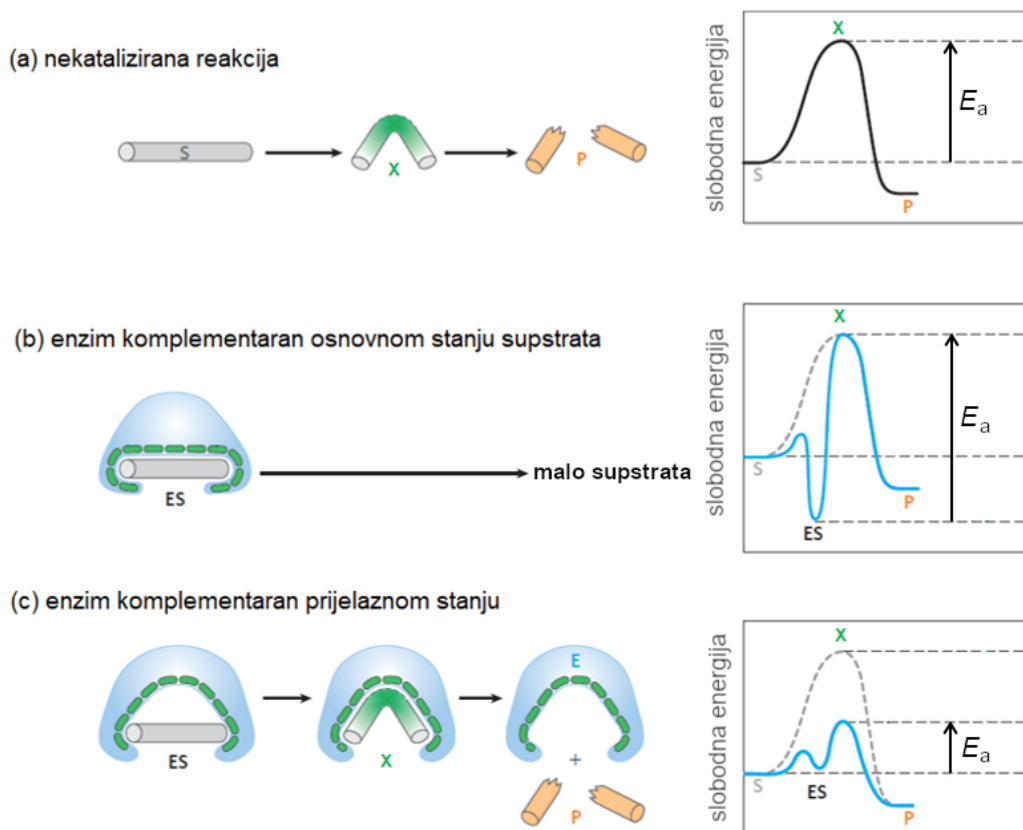
3. SUPSTRATNA I KATALITIČKA DISKRIMINACIJA – UTJECAJ NA KATALITIČKU EFIKASNOST

Enzimi mogu biti selektivni za pripadne supstrate tako da s njima uspostavljaju više povoljnih interakcija u odnosu na nepripadne supstrate u osnovnom (supstratna diskriminacija) ili u prijelaznom stanju (katalitička diskriminacija). U pravilu bi supstratna diskriminacija trebala povećavati K_M , a katalitička smanjivati k_{cat} nepripadnog supstrata u odnosu na pripadni, ali obje

vrste diskriminacije mogu utjecati na više parametara jer su kinetičke konstante enzimskih reakcija međusobno povezane (Tawfik 2014).

Efikasnost katalize se temelji na smanjenju razlike u slobodnoj energiji između osnovnog i prijelaznog stanja molekule. Uspostavljanje pozitivnih interakcija sa supstratom u osnovnom stanju stabilizira kompleks enzim-supstrat (ES) i smanjuje mu slobodnu energiju, dok uspostavljanje pozitivnih interakcija s prijelaznim stanjem stabilizira i smanjuje slobodnu energiju kompleksa enzim-prijelazno stanje (EX). Zbog toga povećanje selektivnosti na temelju supstratne diskriminacije može imati negativan utjecaj na efikasnost katalize i brzinu kemijske reakcije – smanjenje slobodne energije osnovnog stanja pripadnog supstrata povećava razliku u slobodnoj energiji kompleksa ES i EX, odnosno povećava energiju aktivacije. Ovo smanjenje efikasnosti katalize se očituje u uvjetima u kojima je enzim zasićen supstratom, dok u uvjetima nižih koncentracija supstrata bolje vezanje osnovnog stanja može značajno povećati broj reakcija u jedinici vremena povećanjem udjela produktivnih sudara enzima i supstrata. Pri visokim koncentracijama pripadnog supstrata ($c \geq K_M$), k_{cat} je smanjen jednakim faktorom kao i K_M , tako da k_{cat}/K_M pripadnog supstrata, a time i faktor diskriminacije nepripadnog supstrata, ostaju jednaki unatoč poboljšanom vezanju pripadnog supstrata. Prema tome se supstratna diskriminacija može postići tako da se K_M pripadnog supstrata poveća na vrijednost veću od fiziološke koncentracije, a K_M nepripadnog supstrata na vrijednost značajno veću od K_M pripadnog supstrata. Dakle, supstratna diskriminacija nije temeljno optimizirana poboljšanjem vezanja i smanjenjem K_M pripadnog supstrata, nego otežavanjem vezanja i povećanjem K_M nepripadnog supstrata (Tawfik 2014). Velik broj aaRS diskriminira nepripadne AA primarno mehanizmima supstratne diskriminacije (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020), primjerice TyrRS, LeuRS, IleRS i ValRS (de Prat Gay i sur. 1993; Cvetešić i sur. 2014; Živković i sur. 2020).

U slučaju katalitičke diskriminacije, povećanje selektivnosti pozitivno utječe na efikasnost katalize i brzinu kemijske reakcije jer uspostavljanje dodatnih povoljnih interakcija s prijelaznim stanjem pripadnog supstrata stabilizira prijelazno stanje i smanjuje energiju aktivacije. Vizualni prikaz utjecaja stabilizacije ES i/ili EX se nalazi na Slici 2. I katalitička diskriminacija ima značajnu ulogu u TyrRS, za diskriminaciju D-Tyr čiji je K_M čak manji nego za pripadni L-Tyr (Calendar i Berg 1967). Katalitička diskriminacija je također primarni način isključivanja nepripadnih supstrata na temelju identiteta AA uz peptidnu vezu koja se hidrolizira u kimotripsinskim serinskim proteazama (Perona i sur. 1995; Hedstrom 2002).



Slika 2. Promjene slobodne energije u (a) nekataliziranoj reakciji, (b) reakciji u kojoj enzim stabilizira osnovno stanje supstrata i (c) reakciji u kojoj enzim stabilizira prijelazno stanje. S označava osnovno stanje supstrata, ES kompleks enzima i supstrata, X prijelazno stanje, P produkt, E enzim, a E_a energiju aktivacije. Preuzeto i prilagođeno prema Nelson i Cox (2012).

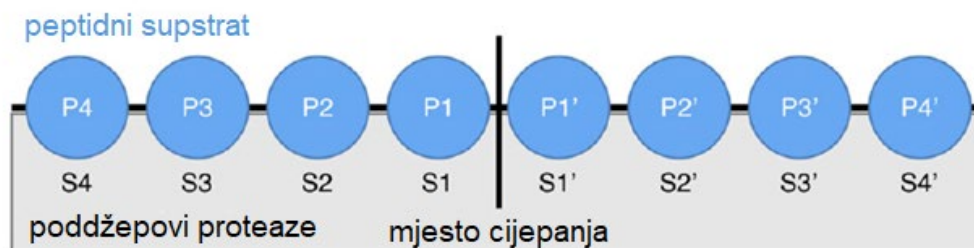
4. PREPOZNAVANJE I POZICIONIRANJE SUPSTRATA U SERINSKIM PROTEAZAMA I AARS

4.1. Prepoznavanje i pozicioniranje supstrata u serinskim proteazama

Enzimi koji pripadaju kimotripsinskoj porodici serinskih proteaza imaju karakterističan motiv – dvije β -bačvaste ploče, povezane s dvije površinske omče i disulfidnom vezom Cys191-Cys220, na čijem se sučelju nalazi katalitička trijada Ser-His-Asp. Tri lanca β -bačvastih ploča formiraju džep koji veže AA supstrata najvažniju za specifičnost kimotripsinskih serinskih proteaza – AA na acilnoj strani peptidne veze koja će biti hidrolizirana. Ove očuvane strukture su važne za produktivno pozicioniranje supstrata kako bi moglo doći do hidrolize peptidne veze. Strukture kimotripsinskih serinskih proteaza distalne u odnosu na katalitičko aktivno mjesto, primjerice površinske omče, imaju puno veću varijabilnost. Ovakva divergencija distalnih dijelova

enzima omogućuje puno brže promjene u specifičnosti bez narušavanja strukture i funkcije aktivnog mjesta (Perona i Craik 1997).

Aminokiselinama supstrata serinskih proteaza su prema nomenklaturi Schechter i Berger (1967) pripisane oznake P_n (za AA na strani acilne skupine) i P_n' (za AA na strani izlazne skupine), pri čemu n predstavlja broj koji odgovara udaljenosti od peptidne veze koja će biti hidrolizirana (veze P₁-P₁'). Određene aminokiseline supstrata sjedaju u poddžepove šupljine za vezanje supstrata. Poddžepovima su pripisane oznake analogne aminokiseliniskima, S_n i S_n'. Slika 3 prikazuje skicu interakcije supstrata i enzima s navedenim oznakama P i S.



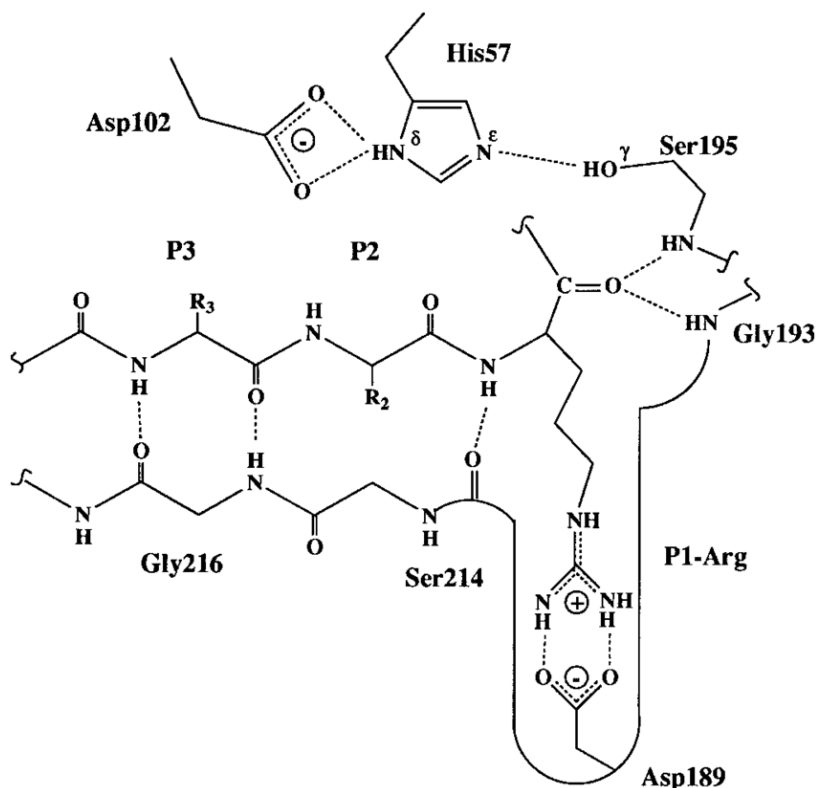
Slika 3. Nomenklatura aminokiselina peptidnog supstrata (P₁-P₄, P₁'-P₄') i poddžepova veznog mjesta serinskih proteaza (S₁-S₄, S₁'-S₄'). N-terminalni kraj supstrata se nalazi na lijevoj, a C-terminalni na desnoj strani. Preuzeto i prilagođeno prema Waldner i sur. 2018.

4.1.1. Tripsin, kimotripsin i elastaza

Među najbolje istraženim kimotripsinskim serinskim proteazama su tripsin, kimotripsin i elastaza. Njihove funkcije variraju među različitim tipovima organizama i tkiva. U sisavaca, tripsin, kimotripsin i izozim elastaze proizveden u gušterači su probavni enzimi (Owen 2006; *Stool elastase* n.d.), dok neutrofilna elastaza ima ulogu u imunosnom odgovoru (Cotten 2020). Specifičnost ovih enzima je definirana prema AA supstrata na P₁ poziciji – tripsin cijepa peptidnu vezu iza pozitivno nabijenih AA, kimotripsin iza velikih hidrofobnih AA, a elastaza iza malih hidrofobnih AA (Perona i Craik 1997). Kimotripsin vrlo efikasno diskriminira supstrate s manjim AA na mjestu P₁ – faktor diskriminacije supstrata s P₁-Ala u odnosu na P₁-Phe je 5×10^4 . Tripsin također ima visoku razinu selektivnosti prema supstratima s odgovarajućom AA na P₁ poziciji, točnije, faktor diskriminacije supstrata s P₁-Tyr u odnosu na P₁-Arg je $4,3 \times 10^5$. Kimotripsin pokazuje i određenu selektivnost prema supstratima koji na P₁' poziciji imaju pozitivno nabijene AA. Za razliku od S₁, poddžepovi S₂ i S₃ u kimotripsinu su niskoselektivni, S₃ toliko da može akomodirati i D-AA (Hedstrom 2002). Niska selektivnost poddžepova S₂ i S₃ nije karakteristika

svih kimotripsinskih serinskih proteaza. Elastaza primjerice pokazuje preferenciju prema cijepanju supstrata s Ala na P3 poziciji u odnosu na supstrate s Lys na P3, te još veću preferenciju prema cijepanju supstrata s aromatskom skupinom na toj poziciji (Bode i sur. 1989).

Još jedna karakteristika kimotripsinskih serinskih proteaza je vezanje supstrata tako da interakcije enzima s P1-P3 dijelom supstrata rezultiraju strukturom antiparalelne β -ploče (β -ploča je struktura u kojoj su okosnice polipeptida povezane vodikovim vezama između karbonilnog kisika i amino skupine; u antiparalelnoj β -ploči su amino i karboksilni krajevi polipeptida u suprotnoj orijentaciji). Ove interakcije uzrokuju naizmjenično suprotnu orijentaciju bočnih ogranaka u peptidnom supstratu. AA enzima koja stvara vodikove veze s P3 je Gly216 u tripsinu i kimotripsinu te Val216 u elastazi, pri čemu je važno napomenuti da je konformacija Gly216 u tripsinu drugačija od one u kimotripsinu (Perona i Craik 1995; Perona i Craik 1997; Hedstrom 2002). Interakcije tripsina s P1-P3 dijelom supstrata su prikazane na Slici 4. Ove interakcije su važne za komunikaciju mjesta za vezanje supstrata s katalitičkom trijadom (Hedstrom 2002).



Slika 4. Interakcije tripsina s P1-P3 dijelom peptidnog supstrata. Vodikove veze (prikazane isprekidanim crtama) između okosnice peptidnog supstrata i okosnice enzima formiraju strukturu antiparalelne β -ploče. Preuzeto i prilagođeno prema Perona i Craik (1997).

Interakcija kimotripsinskih serinskih proteaza s P2-P4 je ključna za produktivno pozicioniranje peptidne veze P1-P1'. Veći broj Sn-Pn i Sn'-Pn' interakcija pozitivno utječe na efikasnost katalize, tako da serinske proteaze preferencijalno cijepaju polipeptide u odnosu na kratke peptide (Perona i sur. 1995; Hedstrom 2002).

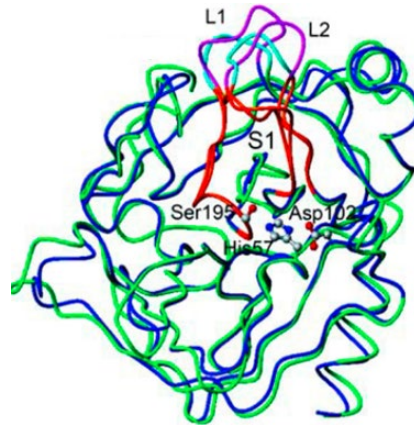
U elastazi je poddžep S1 plitka hidrofobna udubina, dok su kod tripsina i kimotripsina to duboke šupljine, pri čemu se na dnu tripsinskog S1 nalazi pozitivno nabijeni Asp. Iako su samo AA poddžepa S1 u neposrednoj interakciji s P1 (AA supstrata prema kojoj je kategorizirana specifičnost kimotripsinskih serinskih proteaza), supstitucija svih AA koje grade tripsinski S1 s odgovarajućim kimotripsinskim AA ne mijenja specifičnost tripsina u specifičnost kimotripsina. Za ovu zamjenu specifičnosti su potrebne i mutacije površinskih omči enzima – omče L1 (građene od AA na pozicijama 185-188) i omče L2 (građene od AA na pozicijama 221-224). Dodatna supstitucija Tyr172Trp povećava afinitet Tr→Ch prema kimotripsinskim supstratima tako što mijenja strukturu baze poddžepa S1 (Perona i Craik 1997; Hedstrom 2002).

Jednostavna supstitucija Asp189 u dnu tripsinskog S1 sa Ser koji se nalazi na tom mjestu u kimotripsinu rezultira neefikasnom i neselektivnom proteazom jer ova supstitucija deformira S1 tripsina. Duboke šupljine poput tripsinske i kimotripsinske S1 su inherentno nestabilne strukture. Uz to, ova mutacija pomiče ravnotežu konformacija tripsinskog S1 prema inaktivnoj konformaciji kakva je prisutna u tripsinogenu (zimogenu tripsina, odnosno obliku tripsina prije proteolitičke aktivacije) (Hedstrom 2002). Strukture tripsina i kimotripsina su prikazane na Slici 5.

Površinske omče utječu na selektivnost enzima određivanjem specifične konformacije AA koje stupaju u interakcije sa supstratom i modulacijom fleksibilnosti mjesta vezanja supstrata. Omče L1 i L2 u tripsinu i kimotripsinu stabiliziraju strukturu S1, određuju konformaciju Gly216 i posreduju u iskorištavanju energije vezanja u mjestima S2-S4 u visoke stope acilacije. Vodikove veze koje Gly216 uspostavlja s P3 imaju ulogu u pozicioniranju P1-P1' peptidne veze odgovarajućih supstrata. Orijehtacija Gly216 karakteristična za tripsin uzrokuje neproduktivnu orijentaciju supstrata. Da bi se „popravilo“ ovakvo pozicioniranje i postigla produktivna orijentacija supstrata u tripsinu, potrebne su elektrostatske interakcije P1-Lys ili P1-Arg s Asp189 u poddžepu S1 (Perona i sur. 1995).

Mutacije S1, L1, L2 i AA 172 mogu unijeti kimotripsinsku specifičnost u tripsin, ali ne mogu unijeti elastaznu specifičnost u tripsin ni tripsinsku specifičnost u kimotripsin. Za ove

konverzije su potrebne druge strukturne promjene (Hedstrom 2002; Perona i sur. 1995), ali transformacija Tr→Ch unatoč tome pruža važan uvid u važnost distalnih elemenata za specifičnost i selektivnost enzima.



Slika 5. Preklopljene strukture tripsina (zeleni) i kimotripsina (plavi) s istaknutim površinskim omčama L1 i L2 (ljubičasta za tripsinske, tirkizna za kimotripsinske) i podžepom S1 (crveni) s označenim aminokiselinama katalitičke trijade. Preuzeto i prilagođeno prema Ma i sur. 2005.

4.1.2. Faktor D, α -litička proteaza i uloge konformacijske promjene

Trypsin, kimotripsin i elastaza imaju relativno rigidno aktivno mjesto, ali to nije slučaj za sve kimotripsinske serinske proteaze. Faktor D, proteaza u sastavu komplementa (dio imunskog sustava), i α -litička proteaza (bakterijski enzim) postižu selektivnost mehanizmima induciranog pristajanja. Inducirano pristajanje doprinosi selektivnosti ako je konformacijska promjena enzima najsporiji korak reakcije koji posljedično određuje njezinu brzinu. U tom slučaju vezanje pripadnog supstrata može ubrzati konformacijsku promjenu enzima, a time i čitavu reakciju, dok će reakcija s nepripadnim supstratom biti značajno sporija. Za razliku od većine proteaza koje cirkuliraju krvlju u obliku zimogena, faktor D cirkulira u svom zrelom obliku. Njegova visoka razina specifičnosti i selektivnosti omogućuju da pri tome ne oštećuje tkiva; on ima samo jedan prirodni supstrat – kompleks komplementa C3bB. Bez vezanog supstrata, podžepovi S1-S4 i katalitička trijada faktora D su deformirani. Vezanje C3bB inducira poprimanje aktivne konformacije (Hedstrom 2002).

Mehanizam induciranog pristajanja također može omogućiti enzimu specifičnost za veći broj različitih supstrata na način da različiti supstrati induciraju različite odgovarajuće konformacije koje specifično akomodiraju njihovo prijelazno stanje. Sličan mehanizam je prisutan

u Met192Ala mutantu α -litičke proteaze. Supstrati divljeg tipa α -litičke proteaze su polipeptidi s malim AA na poziciji P1. Poddžep S1 je relativno rigidan i smanjen s Met192. Mutacija Met192A povećava fleksibilnost podžepa S1 time što narušava interakcije njegovih nasuprotnih strana. To omogućuje neovisno pomicanje dvije strane S1 i akomodaciju AA različitih veličina. Ovakav mutirani enzim pokazuje puno slabiju selektivnost od divljeg tipa – divlji tip diskriminira supstrate s P1-Phe faktorom $5,5 \times 10^4$ u odnosu na P1-Ala, dok mutant Met192Ala ima usporedive k_{cat}/K_M vrijednosti za obje AA (Hedstrom 2002). Vrijednosti k_{cat}/K_M divljeg tipa i mutanta Met192Ala α -litičke proteaze prema supstratima s P1-Ala i P1-Phe su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Specifičnosti divljeg tipa i mutanta Met192Ala α -litičke proteaze. Podatci preuzeti iz Hedstrom (2002).

supstrat	k_{cat}/K_M ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	divlji tip	Met192Ala
Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA	$2,1 \times 10^4$	1×10^4
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	0,38	$3,1 \times 10^5$

4.2. Prepoznavanje i pozicioniranje AA u aaRS

AaRS su podijeljene u dva razreda na temelju strukture aktivnog mjesta. Svaka aaRS ima predstavnike isključivo unutar jednog razreda, osim LysRS, koja se razvila i u razredu I (Lys I) i u razredu II). Podjela aaRS u razrede prikazana je u Tablici 2. Razred I aaRS sadrži očuvanu HUP domenu sa strukturom Rossmannovog tipa koja je građena od motiva HIGH i KMSKS, nazvanima po slijedovima aminokiselina. HIGH i KMSKS imaju ulogu u stabilizaciji aminoacil-adenilata. HUP domena može sadržavati i jedan ili dva povezujuća peptida (CP1 i CP2) koji su uključeni u popravak pogreške u aaRS razreda I. AaRS razreda II imaju aktivno mjesto koje se sastoji od antiparalelne β -ploče i tri manje očuvana motiva (Arnez i Moras 1997; Ibba i Söll 2000; Iverson 2016; Gomez i Ibba 2020). Motiv 1 je važan za dimerizaciju (aaRS razreda II su uglavnom dimeri, dok su razred I uglavnom monomeri), a motivi 2 i 3 za prepoznavanje ATP-a i AA (Ibba i Söll 2000; Iverson 2016). Razredi I i II se razlikuju i po načinu vezanja svih supstrata (ATP-a, tRNA i AA) i po kinetici aminoacilacije. Kod aaRS razreda I, najsporiji korak reakcije je otpuštanje aminoacilirane tRNA, dok je u razredu II najsporiji korak aktivacija AA (Gomez i Ibba 2020).

Tablica 2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede

razred I	razred II
ValRS	GlyRS
LeuRS	SerRS
IleRS	ThrRS
MetRS	HisRS
CysRS	ProRS
ArgRS	LysRS I
LysRS I	AspRS
GluRS	AsnRS
GlnRS	AlaRS
TyrRS	PheRS
TrpRS	

Dok su tRNA velike molekule sa specifičnim identitetnim elementima koji mogu uspostaviti velik broj interakcija s aaRS, AA su značajno manje molekule među kojima mnoge imaju slična kemijska svojstva (Iverson 2016; Gomez i Ibba 2020). Stoga je diskriminacija AA zahtjevniji zadatak za aaRS. Inicijalna selektivnost (razina selektivnosti prije djelovanja mehanizama popravka pogreške) aaRS prema AA je većinskim dijelom određena korakom aktivacije AA. Neke aaRS su dodatno selektivne u koraku aminoacilacije tRNA. Na primjer, selektivnost GlnRS se povećava 10^3 puta tijekom prijenosa aminoacilne skupine na tRNA, ali ovo nije široko rasprostranjeno među aaRS (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

Stopa pogrešne aminoacilacije je oko 10^{-4} (Ibba i Söll 2000; Iverson 2016), pri čemu u određenim organizmima (uglavnom parazitskim), organelima ili uvjetima staničnog stresa može biti i značajno viša (Gomez i Ibba 2020; Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). U nekim aaRS nije moguće postići ovako nisku stopu pogreške tijekom same aminoacilacije zbog sličnosti u strukturi i kemijskim svojstvima nekih nepripadnih aminokiselina s pripadnom te posljedičnim ograničenim mogućnostima diskriminacije. Primjerice, IleRS diskriminira Val faktorom 200 tijekom aminoacilacije, što nije dostatna razina selektivnosti za održavanje života (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). U ovakvim slučajevima aaRS imaju razvijenu aktivnost popravka pogreške koja selektivno hidrolizira produkte pogrešne aktivacije ili pogrešne aminoacilacije (Ibba i Söll 2000; Iverson

2016). Mjesta prepoznavanja AA su različito građena u različitim aaRS zbog potrebe za specifičnošću i selektivnošću, ali postoje zajedničke karakteristike unutar svakog razreda.

4.2.1. AaRS razreda I

Mjesta prepoznavanja AA u aaRS razreda I su relativno otvorena i fleksibilna (Arnez i Moras 1997). Aktivacija AA je u aaRS razreda I katalizirana energijom vezanja ATP-a koja omogućuje motivu KMSKS stabilizaciju prijelaznog stanja. KMSKS se, zajedno s motivom HIGH, nalazi na pokretnoj omći koja prilikom vezanja i aktivacije AA mijenja strukturu i uzrokuje konformacijske promjene u nekim aaRS (Ibba i Söll 2000). Vodikova veza između α -amino skupine AA supstrata i proteinske okosnice veznog mjesta je očuvana među aaRS razreda I. Interakcije s karboksilnom skupinom supstrata su manje očuvane te se podjednako frekvencijom ostvaruju vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama. Način vezanja bočnih ogranka supstrata ovisi o njihovim kemijskim svojstvima – nepolarni ogranci su vezani van der Waalsovima interakcijama, nabijeni ogranci su dodatno vezani elektrostatskim interakcijama, ogranci s amidnom skupinom vodikovim vezama, a aromatski ogranci π -slaganjem. CysRS koristi ion cinka za specifično prepoznavanje sumpora u bočnom ogranku (Kaiser i sur. 2020).

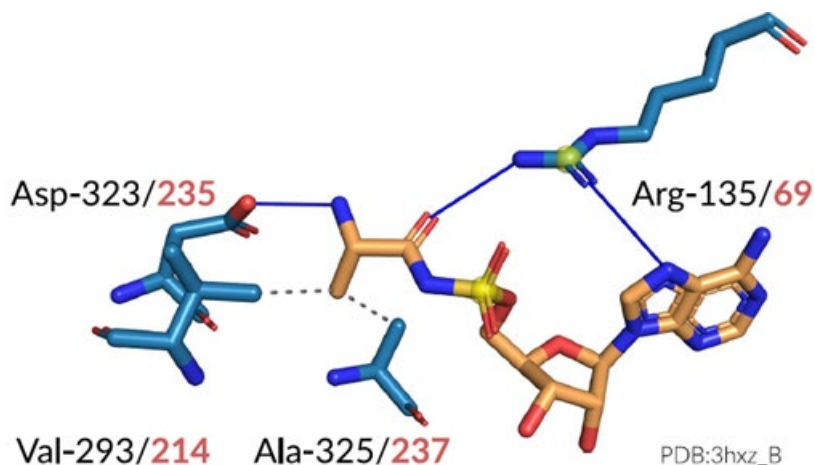
Posebna karakteristika nekih aaRS razreda I je ovisnost aktivacije AA o tRNA. To su GlnRS, ArgRS, GluRS i LysRS I. U tim enzimima dolazi i do povećanja afiniteta prema pripadnoj AA nakon vezanja odgovarajuće tRNA, primjerice tako da terminalni adenzin tRNA^{Gln} mijenja orijentaciju aromatskih bočnih ogranka u veznom mjestu GlnRS (Ibba i Söll 2000; Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

Specifičnost i selektivnost aaRS ne ovisi samo o AA u neposrednoj interakciji sa supstratom. Slično kao što se specifičnost tripsina ne može promijeniti u kimotripsinsku mutacijom samo AA u S1, tako se ni specifičnost GlnRS ne može zamijeniti za specifičnost GluRS samo mutacijom AA u aktivnom mjestu (Kaiser i sur. 2020). Determinante specifičnosti za Gln postoje i izvan samog veznog mjesta GlnRS (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). Mjesta za vezanje supstrata u enzimima ne postoje neovisno o okolini, već su uklopljena u ukupnu strukturu proteina s kojom stupaju u brojne interakcije. Te interakcije mogu imati značajan utjecaj na strukturu i funkciju veznog mjesta (McBride i sur. 2022).

4.2.2. AaRS razreda II

U kontrastu s fleksibilnim i otvorenim veznim mjestima razreda I, mjesta vezanja AA u aaRS razreda II su značajno manja (Kaiser i sur. 2020) i rigidnija (Arnez i Moras 1997; Ibba i Söll 2000). Konformacija AA-veznog mjesta pozicionira pripadnu AA optimalno za formiranje prijelaznog stanja. Značajna iznimka u vidu rigidnosti je AlaRS, koji ima relativno fleksibilno mjesto vezanja AA. Zbog toga AlaRS može vezati i Gly, koji je manji od pripadnog Ala, i Ser, koji je veći od Ala, pri čemu sve tri AA pozicionira na gotovo isti način (Guo i Schimmel 2012). Interakcije aaRS s α -amino skupinom i karboksilnom skupinom pripadnih AA su očuvanije u razredu II nego u razredu I, a riječ je o istom tipu interakcija – α -amino skupina je vezana vodikovim vezama, a karboksilna vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama. Interakcije s bočnim ograncima supstrata su ovisne o kemijskim svojstvima pojedinih ogranaka, na sličan način kao kod aaRS razreda I. Posebna je ThrRS koja koristi ion cinka za prepoznavanje hidroksilne skupine u bočnom ogranku, ali i za vezanje α -amino skupine. U razred II spada i GlyRS koja ne može uspostaviti interakcije s bočnim ogrankom Gly jer ta AA nema bočni ogranak (Kaiser i sur. 2020).

Interakcije analoga Ala s veznim mjestom u AlaRS su prikazane na Slici 6. Neke od očuvanih AA u veznom mjestu AlaRS su Arg i Asp čiji bočni ogranci uspostavljaju vodikove veze s karboksilnom, odnosno α -amino skupinom Ala te hidrofobne AA (Val i Ala/Gly) koje van der Waalsovima interakcijama prepoznaju β -C atom supstrata (Guo i Schimmel 2012; Kaiser i sur. 2020). Asp u veznom mjestu predstavlja posebni problem za AlaRS. Uz vodikovu vezu s α -amino skupinom, on može stvoriti dodatnu vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom Ser, što otežava njegovu diskriminaciju. Ovaj fenomen je detaljnije objašnjen u potpoglavlju 2.3. Paradoks hidroksilne skupine. AlaRS tijekom evolucije nije mogla izgubiti taj Asp jer je on nužan za vezanje i aktivaciju Ala. Njegova supstitucija s Ala je letalna, a čak i zamjena s drugom negativno nabijenom AA, Glu, značajno smanjuje efikasnost aktivacije Ala i koeficijent diskriminacije Ser i Gly (koji s 300-500 pada na 19). Stoga je taj Asp univerzalno očuvan u AlaRS (Guo i Schimmel 2012; Gomez i Ibba 2020; Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).



Slika 6. Interakcije AlaRS iz bakterije *Escherichia coli* s analogom alanina. Vodikove veze su označene punim plavim linijama, a van der Waalsove interakcije isprekidanim sivim linijama. Preuzeto i prilagođeno prema Kaiser i sur. 2020.

5. MEHANIZMI POPRAVKA POGREŠKE AARS

AaRS koje u inicijalnoj aktivaciji AA i aminoacilaciji tRNA ne postižu fiziološki zadovoljavajuću razinu selektivnosti imaju dodatne mehanizme za hidrolizu aktivirane nepripadne AA (popravak pogreške prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA, eng. *pre-transfer editing*) ili tRNA aminoacilirane s nepripadnom AA (popravak pogreške nakon prijenosa aminoacilne skupine na tRNA, eng. *post-transfer editing*). Pojedine aaRS mogu imati više mehanizama popravka pogreške, ali je jedan u pravilu dominantan (Dulić i sur. 2010; Martinis i Boniecki 2010; Perona i Gruić-Sovulj 2013; Živković i sur. 2022).

Postojanje aktivnosti popravka pogreške u aaRS je prvi predložio Fersht (1977) na temelju selektivnosti IleRS prema Val. Prema modelu dvostrukog sita, aaRS prvo u sintetskom aktivnom mjestu (grublje sito) isključuje AA veće od pripadne, a zatim u aktivnom mjestu za popravak pogreške (finije sito) uklanja AA koje su manje ili izosterične u odnosu na pripadnu (Fersht i Dingwall 1979). Ovaj model je previše reduktivan zbog oslanjanja isključivo na isključivanje steričkim smetnjama u oba koraka, ali je primjenjiv na aaRS kojima najveći problem u smislu diskriminacije predstavljaju AA koje su za jednu metilensku skupinu manje od pripadne, na primjer Val-IleRS i Ser-ThrRS (Guo i Schimmel 2012; Perona i Gruić-Sovulj 2013). Revidirani model (Fersht 1985) uključuje i korištenje aktivnog mjesta za popravak pogreške za uklanjanje AA koje imaju dodatnu hidroksilnu skupinu u odnosu na pripadnu, na primjer Ser-AlaRS i Tyr-PheRS. AlaRS u mjestu za popravak pogreške prepoznaje Ser pomoću polarnih interakcija te potencijalno

interakcijama sa Zn^{2+} . Mjesto za popravak pogreške PheRS prepoznaje Tyr specifičnim vodikovim vezama s njegovom hidroksilnom skupinom (Perona i Gruić-Sovulj 2013; Živković i sur. 2022). Općenito, vrijedi pravilo: neprikladna AA koju je zbog određenog svojstva teško isključiti u sintetskom aktivnom mjestu bit će uklonjena u aktivnom mjestu za popravak pogreške (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020).

5.1. Popravak pogreške poslije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA

Hidrolitičko cijepanje pogrešno aminoacilirane tRNA se odvija u zasebnoj domeni odvojenoj od sintetskog aktivnog mjesta (Martinis i Boniecki 2010, Perona i Gruić-Sovulj 2013). U aaRS razreda I koje imaju ovu aktivnost (ValRS, LeuRS i IleRS) (Živković i sur. 2022) se ta domena nalazi na CP1 umetnutom u HUP domenu, te je od sintetskog mjesta udaljena 30-40 Å. U aaRS razreda II koje posjeduju tu aktivnost (AlaRS, ThrRS, ProRS, PheRS) (Gruić-Sovulj i sur. 2007), popravak pogreške poslije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA se odvija u domenama koje su specifične za pojedini enzim (Perona i Gruić-Sovulj 2013; Gomez i Ibba 2020).

Dva su osnovna mehanizma prijenosa pogrešno aminoaciliranog 3'-kraja tRNA u aktivno mjesto za popravak pogreške. AA-tRNA može disocirati s enzima i potom se vezati u mjesto za popravak pogreške ili može doći do translokacije aminoaciliranog 3'-kraja tRNA unutar same aaRS, bez disocijacije. Mehanizam koji uključuje disocijaciju je značajniji za aaRS razreda II, ali ima značajan doprinos i u IleRS. Ova razlika među razredima aaRS je konzistentna s razlikama u njihovoj kinetici – u aaRS razreda II je disocijacija AA-tRNA relativno brza, dok je u aaRS razreda I to najsporiji korak katalize (Ling i sur. 2009; Perona i Gruić-Sovulj 2013; Živković i sur. 2022).

Selektivnost domena za popravak pogreške prema neprikladnim AA može biti visoka i dobro definirana, kao što je slučaj u ProRS i AlaRS, čija mjesta za popravak pogreške specifično vežu AA koje je najteže diskriminirati u sintetskom mjestu. Za razliku od toga, selektivnost mjesta za popravak pogreške IleRS se pokazala izrazito niskom – IleRS može hidrolizirati sve pogrešno aminoacilirane tRNA^{Ile} podjednakom efikasnošću. Niska efikasnost hidrolize ispravno aminoacilirane Ile-tRNA^{Ile} je postignuta katalitičkom diskriminacijom koja je razvijena negativnom selekcijom – IleRS specifično destabilizira prijelazno stanje i time sprječava hidrolizu Ile-tRNA^{Ile} (Živković i sur. 2022).

5.2. Popravak pogreške prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA

Hidroliza aminoacil-adenilata (AA-AMP) nastalog aktivacijom nepripadne AA obuhvaća tri osnovna mehanizma – enzimsku hidrolizu neovisnu o tRNA, enzimsku hidrolizu ovisnu o tRNA te selektivno otpuštanje AA-AMP u otopinu i neenzimska hidroliza. Popravak pogreške prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA je vrlo zahtjevno okarakterizirati, a jedan od razloga za to je nestabilnost AA-AMP-a. Zbog toga postoje rasprave o tome odvija li se ta aktivnost u sintetskom aktivnom mjestu ili u posebnoj domeni za popravak pogreške (Martinis i Boniecki 2010), pri čemu više dokaza upućuje na to da se popravak pogreške prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA odvija u sintetskom aktivnom mjestu (Dulić i sur. 2010; Perona i Gruić-Sovulj 2013).

Enzimsku hidrolizu AA-AMP neovisnu o tRNA je prisutna i u aaRS razreda I i u aaRS razreda II, ali nije sigurno da je ta aktivnost značajna u aaRS koje posjeduju i domenu za popravak pogreške nakon prijenosa aminoacilne skupine na tRNA – ona obuhvaća samo 3% ukupne aktivnosti popravka pogreške ValRS, LeuRS i IleRS. Ni selektivno otpuštanje AA-AMP nije značajno u ta tri enzima. Međutim, ThrRS i ProRS pokazuju veću aktivnost ovog puta – ThrRS za uklanjanje Ser, a ProRS za uklanjanje Ala. SerRS, MetRS i LysRS II nemaju domene za popravak pogreške nakon prenošenja, pa su ograničene na popravak pogreške prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA. SerRS koristi i selektivno otpuštanje i tRNA-neovisnu hidrolizu AA-AMP za uklanjanje nepripadnih AA. Mehanizmi uklanjanja nepripadnih AA u MetRS i LysRS II uključuju ciklizaciju. Konkretno, MetRS katalizira ciklizaciju aktiviranog homocisteina pri čemu nastaje homocistein tiolakton, a LysRS II katalizira ciklizaciju aktiviranih homoserina i ornitina pri čemu nastaju lakton i laktam (Gruić-Sovulj i sur 2007; Perona i Gruić-Sovulj 2013).

Enzimsku hidrolizu AA-AMP ovisnu o tRNA je dokazano značajna samo u IleRS, gdje je njezin doprinos 10 puta veći u odnosu na tRNA-neovisnu reakciju. Ono što omogućuje ovaj mehanizam u IleRS je spori prijenos aktivirane AA na tRNA. Kad je tRNA vezana u sintetskom mjestu aaRS, reakcija prijenosa aminoacilne skupine na tRNA kompetira s hidrolizom AA-AMP. U ValRS se prijenos aminoacilne skupine na tRNA odvija 200 puta brže od hidrolize, tako da se hidroliza AA-AMP ne može događati u značajnom udjelu. Brza prijenos aminoacilne skupine na tRNA je široko rasprostranjen među aaRS. Međutim, prijenos aminoacilne skupine na tRNA i hidroliza nepripadnih AA-AMP se odvijaju podjednako brzinom u IleRS. Ovi omjeri brzina su određujući faktor u tome hoće li popravak pogreške prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA

imati značajnu ulogu u aaRS koje posjeduju i zasebnu domenu za popravak pogreške. Nastavljajući se na usporedbu ValRS i IleRS, popravak pogreške se u ValRS odvija gotovo isključivo nakon aminoacilacije tRNA, dok se u IleRS značajan dio popravaka pogreške odvija prije prijenosa aminoacilne skupine na tRNA (Dulić i sur. 2010; Perona i Gruić-Sovulj 2013).

5.3. Samostojeći proteini za hidrolizu AA-tRNA

Osim mehanizmima samih aaRS, vjernost aminoacilacije se dodatno povećava zasebnim proteinima koji su homologni domenama za popravak pogreške aaRS razreda II. Homologija s tim domenama, ali ne i s CP1, konzistentna je s tim da je disocijacija i ponovno vezanje AA-tRNA mehanizam koji je značajniji u aaRS razreda II nego u aaRS razreda I – u oba slučaja te domene efikasno vežu pogrešno aminoacilirane tRNA iz otopine (Perona i Gruić-Sovulj 2013; Gomez i Ibba 2020).

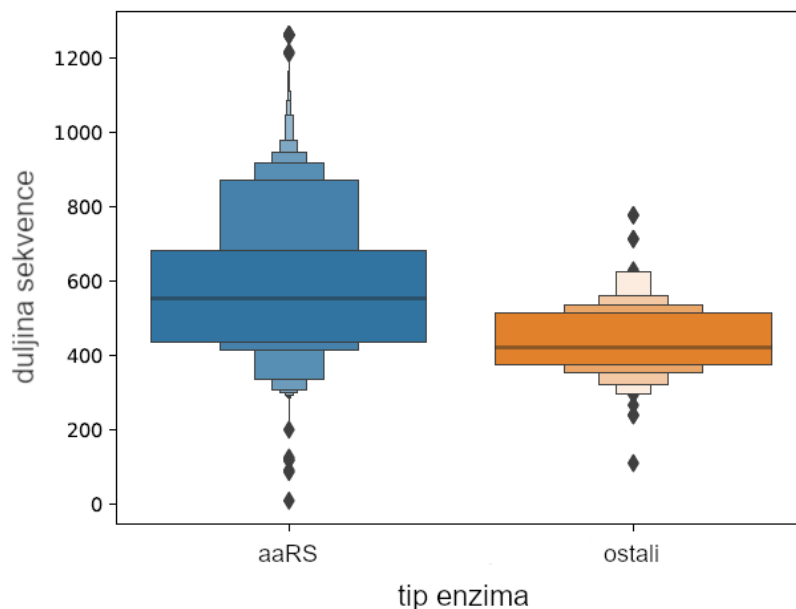
Proteini AlaX su homolozi domene za popravak pogreške AlaRS prisutni i u bakterijama, i u arhejama i u eukariotima. Za razliku od domene za popravak pogreške AlaRS koja hidrolizira i Gly-tRNA^{Ala} i Ser-tRNA^{Ala}, neki AlaX specifično hidroliziraju samo Ser-tRNA^{Ala}. Proteini INS su homolozi domene za popravak pogreške INS koja je karakteristična za ProRS. Među njih spadaju, između ostalih, proteini PrdX i Ybak. Proteini PrdX, poput domene INS u ProRS, specifično hidroliziraju Ala-tRNA^{Pro}. PrdX su prisutni u organizmima čiji ProRS ne posjeduju domenu INS. Proteini Ybak specifično hidroliziraju Cys-tRNA^{Pro} reakcijom ciklizacije kakva se ne odvija u domeni INS ProRS. Za Ybak je zanimljivo i to da je za njegovo djelovanje potrebno vezanje na ProRS te da katalizira hidrolizu Cys-tRNA^{Pro} prije disocijacije s ProRS (Perona i Gruić-Sovulj 2013; Gomez i Ibba 2020).

6. RAZVOJ SELEKTIVNOSTI

Smatra se da je većina enzima evoluirala iz predaka sa širom supstratnom specifičnošću. Nakon duplikacije gena predačkog proteina, mutacijama i horizontalnim prijenosom dolazi do diverzifikacije te nastaje više enzima koji, u najčešćem slučaju, istim mehanizmom kataliziraju isti tip reakcije, ali imaju višu supstratnu specifičnost, višu razinu selektivnosti i veću efikasnost (Könnyű i Czárán 2011; Nam i sur. 2012; Noda-Garcia i sur. 2018; Siddiq i sur 2018). Aktivnosti proteina (uključujući vezanje supstrata) su često prisutne u predačkom proteinu prije duplikacije, iako su se neke razvile i *de novo*. Siddiq i sur. (2018) navode da bi razlog tome mogao biti taj da

geni prisutni u jednoj kopiji imaju više vremena za akumulaciju mutacija i time stjecanje novih funkcija. Duplicirani geni koji ne doprinose fitnessu podložni su gubitku dijelova ili cijele sekvence mutacijama i nasumičnim otklonom (*eng. random drift*). Kako bi se korisna funkcija u proteinu razvila *de novo*, to se mora dogoditi relativno brzo, te se funkcija mora uklopiti u postojeći stanični metabolizam, prije nego što dođe do gubitka sekvence. Kod podjele funkcija predačkog proteina, obje funkcije su već u nekoj mjeri prisutne i uklopljene u metabolizam stanice (Siddiq i sur. 2018).

McBride i sur. (2022) su preko termodinamičnih modela pokazali da veći proteini mogu bolje diskriminirati slične supstrate te da mogu podnijeti veći broj mutacija, a da i dalje imaju pozitivan utjecaj na fitness, što im daje više mogućnosti za evoluciju. U skladu s tom povezanošću veličine i selektivnosti proteina, aaRS su statistički značajno veće od drugih enzima kojima su supstrati AA, kao što je prikazano na Slici 7. Također, među samim aaRS, one koje moraju diskriminirati supstrate koji su za jednu metilensku skupinu manji ili jednu hidroksilnu skupinu veći od pripadnog su u tri od četiri slučaja bile veće od aaRS kojima su ti teško-isključivi supstrati pripadni (McBride i sur. 2022). Veličina doprinosi selektivnosti enzima i mogućnosti evolucije odnosno promjene specifičnosti povećanjem broja distalnih interakcija. Naime, AA koje se nalaze blizu ili unutar aktivnog mjesta imaju velik utjecaj na njegov oblik i funkciju te su zbog toga podložne najstrožem evolucijskom pritisku (Könnnyű i Czárán 2011; McBride i sur. 2022) što im usporava evoluciju (Wu i sur. 2022). Mutacije u distalnim dijelovima enzima, na primjer u površinskim omčama kimotripsinskih serinskih proteaza, ne narušavaju osnovnu strukturu aktivnog mjesta, što ovim elementima omogućuje bržu evoluciju. Interakcijama koje distalni elementi uspostavljaju s ostatkom enzima, oni mogu na vrlo precizan način utjecati na specifičnost i selektivnost, što s jedne strane omogućuje brzu divergenciju supstratne specifičnosti, a s druge brže povećanje selektivnosti (Perona i Craik 1997; Hedstrom 2002; McBride 2022).



Slika 7. Distribucija duljina sekvenci enzima kojima su supstrati aminokiseline. Plavom bojom su prikazane vrijednosti za aminoacil-tRNA-sintetaze, a narančastom ostali enzimi. Preuzeto i prilagođeno prema McBride i sur. 2022.

Unatoč milijardama godina evolucije, enzimi nisu razvili potpunu selektivnost prema pripadnim supstratima. Ta razina selektivnosti nije ni moguća, jer je selektivnost enzima ograničena njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima, kao i svojstvima supstrata. Proteini su relativno fleksibilni jer je većina interakcija koje određuju njihovu tercijarnu i kvaternu strukturu nekovalentna, a fleksibilnost se pokazala kao svojstvo koje korelira s manjom selektivnosti. Osim toga, energija vezanja supstrata je ograničena brojem i jačinom interakcija koju uspostavljaju s enzimom (Peracchi 2018; McBride i sur. 2022). Međutim, to što apsolutnu selektivnost nije moguće postići zbog fizikalno-kemijskih ograničenja ne objašnjava činjenicu da većina enzima ne ostvaruje ni maksimalnu moguću selektivnost (Perrachi 2018). Nam i sur. (2012) procjenjuju da 37% enzima u *E. coli* katalizira reakcije s većim brojem supstrata ili katalizira više različitih tipova reakcija. Je li niža selektivnost eksplicitno selektirano svojstvo enzima? Iako pogreške koje enzimi rade mogu dovesti do inovacija, pogotovo kad je riječ o enzimima koji repliciraju i popravljaju genetičku informaciju, nema dobrih dokaza da postoji pozitivna selekcija niske razine selektivnosti enzima. Iznimka su RNA-polimeraze RNA virusa koje izravno pozitivno utječu na fitnes tih bioloških entiteta. Vjerojatnije objašnjenje za nižu (u usporedbi s mogućom) selektivnost enzima je da selekcijski pritisak za maksimalnu selektivnost nije dovoljno jak da bi se iz populacije uklonili enzimi s nižom razinom selektivnosti (Tawfik 2014).

Iako je selektivnost enzima niža od one koja je maksimalno teoretski moguća, enzimi imaju izrazito veliku selektivnost u usporedbi s nebiološkim katalizatorima (Nelson i Cox 2012). Ova visoka razina selektivnosti je rezultat pozitivne i negativne selekcije. Pozitivna selekcija usmjerava enzime prema razvoju maksimalnog broja pozitivnih interakcija s prijelaznim stanjem pripadnog supstrata. Ovaj tip selekcije je primarno usmjeren prema optimizaciji katalitičke efikasnosti, ali rezultira i većom selektivnosti jer smanjuje vjerojatnost da će enzim moći postići jednaku veznu energiju s nepripadnim supstratom. Pozitivna selekcija relativno sporo povećava selektivnost te sama po sebi nije dovoljna za razvoj visokih razina selektivnosti. Negativna selekcija usmjerava enzime prema razvoju mehanizama za isključivanje određenih nepripadnih supstrata, te je kao takva, za razliku od pozitivne selekcije, izravno usmjerena prema povećanju selektivnosti i u tome djeluje značajno brže (Tawfik 2014).

6.1. Evolucija aaRS

Velik problem s hipotezom da se suvremeni genetički kod razvio prije bilo kakvih aaRS je to da molekule RNA, koje bi u tom scenariju trebale specifično katalizirati aminoacilaciju 20 AA s pripadnim tRNA, imaju ograničenu raznolikost konformacija i katalitičkih aktivnosti. Vjerojatnije je da su ancestralne aaRS postojale tijekom ekspanzije i smanjenja višeznačnosti ranog genetičkog koda, te da su uvođenje novih AA u genetički kod, sužavanje specifičnosti i povećanje selektivnosti aaRS paralelni procesi koji su međusobno utjecali jedni na druge (Iverson 2016; Kaiser i sur. 2020). Predačke aaRS vjerojatno nisu specifično aminoacilirale točno određene AA, nego su implementirale binarni kod – različite aaRS su prepoznavale hidrofobne i polarne AA što bi omogućilo kodiranje hidrofobne srži i polarne površine ranih globularnih proteina (Iverson 2016; Gomez i Ibba 2020). Diverzifikacija i povećanje selektivnosti aaRS su bili postupni procesi. Uvođenje novih AA u genetički kod je ovisilo o građi veznih mjesta ranih aaRS (koja su pružala puno šire mogućnosti prepoznavanja nego ribozimi), tako da su aaRS vrlo vjerojatno utjecale na strukturu današnjeg genetičkog koda (Iverson 2016; Kaiser i sur. 2020).

Suvremene aaRS su specifične za samo jednu AA te imaju izrazito visoku razinu selektivnosti. U procesu usavršavanja tih svojstava je veliku ulogu imala negativna selekcija čiji su tragovi mnogobrojni. Jedan od njih je sama visoka razina selektivnosti aaRS u odnosu na druge enzime čiji su supstrati aaRS. TyrRS diskriminira Phe faktorom $1,3 \times 10^5$, dok ostali enzimi kojima je Tyr supstrat imaju faktor diskriminacije Tyr između 2,6 i 273. CysRS diskriminira Ser i Ala

faktorima reda veličine 10^6 , što je također nekoliko redova veličine više u odnosu na druge enzime. I sam mehanizam kojim CysRS diskriminira Ser je jedinstven i ukazuje na negativnu selekciju. Uz to, CysRS je pod izrazito velikim pritiskom da razvije visoku razinu selektivnosti jer je Cys druga najčešća AA u aktivnim mjestima enzima, ima izrazito važne regulatorne funkcije (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020), te su mu svojstva jedinstvena i ne mogu biti zamijenjena drugom proteinogenom AA (Leluk n.d.) pa postoji velika vjerojatnost da bi pogrešna translacija inaktivirala protein. Na djelovanje negativne selekcije na razvoj selektivnosti ukazuje i visoka stopa kojom aaRS aminoaciliraju neprirodne AA – TyrRS diskriminira β -HNV faktorom 29 (Tawfik i Gruić-Sovulj 2020). Ovaj primjer je nešto opširnije opisan u potpoglavlju 2.2. Negativne interakcije.

7. ZAKLJUČAK

Specifičnost i selektivnost enzima se postižu na temelju interakcija koje supstrati u osnovnom i prijelaznom stanju uspostavljaju s enzimom. Te interakcije mogu biti pozitivne (van der Waalsove, polarne i elektrostatske) ili negativne (steričko i elektrostatsko odbijanje). Među pozitivnim interakcijama s pripadnim supstratom najveću mogućnost selektivnosti pružaju elektrostatske, zatim polarne, a najmanju van der Waalsove interakcije. Utjecaj selektivnosti na katalitičku efikasnost ovisi o načinu postizanja selektivnosti – optimizacija interakcija s pripadnim supstratom u osnovnom stanju povećava energiju aktivacije i može usporavati reakciju, dok optimizacija interakcija s prijelaznim stanjem smanjuje energiju aktivacije i uglavnom ubrzava reakciju. U prepoznavanju supstrata ne sudjeluju samo dijelovi enzima koji sa supstratom uspostavljaju neposredne interakcije, već i distalni dijelovi koji moduliraju fleksibilnost i preciznu strukturu veznog mjesta, primjerice površinske omče kimotripsinskih serinskih proteaza. Ovu ulogu distalnih dijelova enzima je važno uzeti u obzir tijekom laboratorijskog dizajna enzima. Modulacija selektivnosti se može postići i mehanizmom induciranog pristajanja koji s jedne strane omogućuje da vezanje pripadnog supstrata dodatno ubrzava reakciju, a s druge strane može dopustiti enzimu da produktivno pozicionira različite supstrate.

Selektivnost aaRS je značajno viša nego kod ostalih enzima te predstavlja fizikalno-kemijske granice diskriminacije. AaRS su od ostalih enzima manje diskriminatorne jedino prema supstratima s dodatnom hidroksilnom skupinom zbog velikog broja polarnih skupina u aktivnom mjestu aaRS. AaRS koje ne mogu postići fiziološki potrebnu razinu selektivnosti u sintetskoj reakciji povećavaju svoju točnost različitim mehanizmima popravka pogreške. Mehanizmi selektivnosti pojedinih aaRS, a još više njihovi mehanizmi popravka pogreške i svojstva te mehanizmi selektivnosti drugih enzima i dalje predstavljaju puno nepoznanica čije bi otkrivanje poboljšalo dizajn inhibitora i samih enzima za primjenu u medicini, znanosti i industriji.

Povećanje razine specifičnosti i selektivnosti su česti trendovi u evoluciji enzima. Selektivnost se u enzimima može razviti kao posljedica optimizacije katalitičke efikasnosti povećanjem broja interakcija s prijelaznim stanja pripadnog supstrata (pozitivna selekcija) ili izravno isključivanjem nepripadnih supstrata (negativna selekcija). Rane aaRS su vjerojatno također imale široku specifičnost te je njihova postepena specijalizacija bila ključna za ekspanziju i smanjenje višeznačnosti genetičkog koda.

8. Literatura

- Arnez, J. i Moras, D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(6), 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01052-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01052-9)
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Jr. i Stryer, L. (2015). *Enzymes: Basic Concepts and Kinetics*. U *Biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Bode, W., Meyer, E. i Powers, J. C. (1989). Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*, 28(5), 1951–1963. <https://doi.org/10.1021/bi00431a001>
- Calendar, R. i Berg, P. (1967). D-tyrosyl RNA: Formation, hydrolysis and utilization for protein synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 26(1), 39–54. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90259-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90259-8)
- Cotten, S. W. (2020). Evaluation of exocrine pancreatic function. U W. Clarke i M. A. Marzinke (Eds.), *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (4th ed.). Academic Press.
- Cvetešić, N., Palencia, A., Halasz, I., Cusack, S. i Gruić-Sovulj, I. (2014). The physiological target for Leu RS translational quality control is norvaline. *The EMBO Journal*, 33(15), 1639–1653. <https://doi.org/10.15252/embj.201488199>
- de Prat Gay, G., Duckworth, H. W. i Fersht, A. R. (1993). Modification of the amino acid specificity of tyrosyl-tRNA synthetase by protein engineering. *FEBS Letters*, 318(2), 167–171. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80014-L](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80014-L)
- Dulić, M., Cvetešić, N., Perona, J. J. i Gruić-Sovulj, I. (2010). Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 23799–23809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.133553>
- Fersht, A. R. (1977). Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 16(5), 1025–1030. <https://doi.org/10.1021/bi00624a034>
- Fersht, A. R. (1985). Specificity and editing mechanisms. U *Enzyme structure and mechanism*

(2nd ed.). W. H. Freeman and Company.

- Fersht, A. R. i Dingwall, C. (1979). Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein synthesis. Steric exclusion of isoleucine by valyl-tRNA synthetases. *Biochemistry*, *18*(12), 2627–2631. <https://doi.org/10.1021/bi00579a030>
- Gomez, M. A. R. i Ibba, M. (2020). Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA*, *26*(8), 910–936. <https://doi.org/10.1261/rna.071720.119>.
- Gruić-Sovulj, I., Rokov-Plavec, J. i Weygand-Durasevic, I. (2007). Hydrolysis of non-cognate aminoacyl-adenylates by a class II aminoacyl-tRNA synthetase lacking an editing domain. *FEBS Letters*, *581*(26), 5110–5114. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.058>
- Guo, M. i Schimmel, P. (2012). Structural analyses clarify the complex control of mistranslation by tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology*, *22*(1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.11.008>
- Harper, J. W., Cook, R. R., Roberts, C. J., McLaughlin, B. H. i Powers, J. C. (1984). Active site mapping of the serine proteases human leukocyte elastase, cathepsin G, porcine pancreatic elastase, rat mast cell proteases I and II, bovine chymotrypsin A.alpha., and *Staphylococcus aureus* protease V-8 using tripeptide thiobenzyl ester substrates. *Biochemistry*, *23*(13), 2995–3002. <https://doi.org/10.1021/bi00308a023>
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, *102*(12), 4501–4524. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
- Ibba, M. i Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *69*(1), 617–650. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.617>
- Iverson, D. V. (2016). *Analysis of the intricacies of substrate recognition of high mobility group proteins and aminoacyl-tRNA synthetases using non-cognate substrates* [Graduate dissertation]. University of Southern Mississippi.
- Kaiser, F., Krautwurst, S., Salentin, S., Haupt, V. J., Leberecht, C., Bittrich, S., Labudde, D. i Schroeder, M. (2020). The structural basis of the genetic code: Amino acid recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. *Scientific Reports*, *10*(1), 12647. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69100-0>

- Könnyű, B. i Czárán, T. (2011). The evolution of enzyme specificity in the metabolic replicator model of prebiotic evolution. *PLoS ONE*, 6(6), e20931.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020931>
- Leluk, J. (n.d.). *Why cysteine is special? Some basic information about cysteine itself*. Preuzeto 24. 8. 2022. s <https://www.cryst.bbk.ac.uk/pps97/assignments/projects/leluk/project.htm>
- Ling, J., So, B. R., Yadavalli, S. S., Roy, H., Shoji, S., Fredrick, K., Musier-Forsyth, K. i Ibba, M. (2009). Resampling and editing of mischarged tRNA prior to translation elongation. *Molecular Cell*, 33(5), 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.031>
- Ma, W., Tang, C. i Lai, L. (2005). Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop-Motion-Controlled Dynamic Correlation as a Determinant. *Biophysical Journal*, 89, 1183–1193.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.057158>
- Martinis, S. A. i Boniecki, M. T. (2010). The balance between pre- and post-transfer editing in tRNA synthetases. *FEBS Letters*, 584(2), 455–459.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.071>
- McBride, J. M., Eckmann, J.-P. i Tlusty, T. (2022). General theory of specific binding: Insights from a genetic-mechano-chemical protein model. *ArXiv Preprint ArXiv:2202.10698v2*.
<https://doi.org/10.48550/arXiv.2202.10698>
- Minajigi, A., Deng, B. i Francklyn, C. S. (2011). Fidelity escape by the unnatural amino acid β -hydroxynorvaline: An efficient substrate for *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase with toxic effects on growth. *Biochemistry*, 50(6), 1101–1109.
<https://doi.org/10.1021/bi101360a>
- Nam, H., Lewis, N. E., Lerman, J. A., Lee, D.-H., Chang, R. L., Kim, D. i Palsson, B. O. (2012). Network context and selection in the evolution to enzyme specificity. *Science*, 337(6098), 1101–1104. <https://doi.org/10.1126/science.1216861>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2012). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Noda-Garcia, L., Liebermeister, W. i Tawfik, D. S. (2018). Metabolite–enzyme coevolution: From single enzymes to metabolic pathways and networks. *Annual Review of*

- Biochemistry*, 87(1), 187–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012023>
- Owen, C. A. (2006). Serine proteinases. U G. J. Laurent i S. D. Shapiro (Eds.), *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (1st ed.). Academic Press.
- Peracchi, A. (2018). The Limits of Enzyme Specificity and the Evolution of Metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(12), 984–996. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.015>
- Perona, J. J. i Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*, 4(3), 337–360. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040301>
- Perona, J. J. i Craik, C. S. (1997). Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 29987–29990. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.29987>
- Perona, J. J. i Gruić-Sovulj, I. (2013). Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases. U S. Kim (Ed.), *Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology and Medicine* (Vol. 344). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/128_2013_456
- Perona, J. J., Hedstrom, L., Rutter, W. J. i Fletterick, R. J. (1995). Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry*, 34(5), 1489–1499. <https://doi.org/10.1021/bi00005a004>
- Siddiq, M. A., Hochberg, G. K. i Thornton, J. W. (2017). Evolution of protein specificity: Insights from ancestral protein reconstruction. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.07.003>
- Stool elastase: Medlineplus medical test.* (n.d.). MedlinePlus. Preuzeto 25 8. 2022., s <https://medlineplus.gov/lab-tests/stool-elastase/>
- Tawfik, D. S. (2014). Accuracy-rate tradeoffs: How do enzymes meet demands of selectivity and catalytic efficiency? *Current Opinion in Chemical Biology*, 21, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.008>
- Tawfik, D. S. i Gruić-Sovulj, I. (2020). How evolution shapes enzyme selectivity – lessons from aminoacyl-tRNA synthetases and other amino acid utilizing enzymes. *The FEBS Journal*, 287(7), 1284–1305. <https://doi.org/10.1111/febs.15199>

- Voet, D. i Voet, J. G. (2010). Introduction to Enzymes. U *Biochemistry* (4th ed.). John Wiley & Sons.
- Waldner, B. J., Kraml, J., Kahler, U., Spinn, A., Schauerl, M., Podewitz, M., Fuchs, J. E., Cruciani, G. i Liedl, K. R. (2018). Electrostatic recognition in substrate binding to serine proteases. *Journal of Molecular Recognition*, 31(10), e2727. <https://doi.org/10.1002/jmr.2727>
- Wu, Z., Cai, X., Zhang, X., Liu, Y., Tian, G., Yang, J.-R. i Chen, X. (2022). Expression level is a major modifier of the fitness landscape of a protein coding gene. *Nature Ecology & Evolution*, 6(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01578-x>
- Zimmerman, M. i Ashe, B. M. (1977). Substrate specificity of the elastase and the chymotrypsin-like enzyme of the human granulocyte. *Biochimica et Biophysica Acta*, 480(1), 241–245. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90337-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(77)90337-0)
- Živković, I., Ivković, K., Cvetešić, N., Marsavelski, A. i Gruić-Sovulj, I. (2022). Negative catalysis by the editing domain of class I aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Research*, 50(7), 4029–4041. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac207>
- Živković, I., Moschner, J., Koksč, B. i Gruić-Sovulj, I. (2020). Mechanism of discrimination of isoleucyl-tRNA synthetase against nonproteinogenic α -aminobutyrate and its fluorinated analogues. *The FEBS Journal*, 287(4), 800–813. <https://doi.org/10.1111/febs.15053>

9. Životopis

Rođen sam 3. 8. 2000. u Zagrebu. Srednjoškolsko obrazovanje sam završio 2019. godine u V. gimnaziji u Zagrebu s odličnim uspjehom. U četvrtom razredu sam sudjelovao na državnom natjecanju iz biologije. Na državnoj maturi sam se plasirao iznad 90. centila iz svih predmeta (iznad 99 iz biologije i iznad 95,34 iz više razine matematike). Nakon toga sam 2019. godine upisao preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na Noći muzeja 2020. godine sam volontirao u Hrvatskom prirodoslovnom muzeju. Od listopada 2021. do srpnja 2022. sam volontirao na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu genetiku u sklopu projekta dr. sc. Helene Bilandžije, *Evolution in the dark*, u početku u okviru kolegija Laboratorijska stručna praksa, a kasnije izvan okvira kolegija. Tamo sam aktivno sudjelovao u pripremi rada pod nazivom *The pleiotropic effects of melanin loss in cave snails Physella sp.*, izloženog na znanstvenom skupu The 25th Conference On Subterranean Biology održanom u gradu Cluj-Napoca u Rumunjskoj od 18 do 22. 7. 2022., kao jedan od koautora (Grgić M, Weck RG, Keresteš G, Bilandžija H (2022) The pleiotropic effects of melanin loss in cave snails *Physella* sp. ARPHA Conference Abstracts 5: e86885. <https://doi.org/10.3897/aca.5.e86885>).