

Nove funkcije drevnih proteina

Šurlan, Ana Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:217:372661>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ana Marija Šurlan

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Nove funkcije drevnih proteina

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2024. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. rujna 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	1
1.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza po klasama	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Osnovne funkcije aminoacil-tRNA-sintetaza.....	4
2.1.1. <i>Sinteza proteina: aminoaciliranje tRNA odgovarajućim aminokiselinama.....</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Mehanizam visoke preciznosti i njegoa važnost u translaciji proteina.....</i>	<i>5</i>
2.2. Nove funkcije aminoacil-tRNA-sintetaza.....	7
2.2.1. <i>Regulacija transkripcije gena putem humane seril-tRNA-sintetaze: primjer regulacije gena VEGFA.....</i>	<i>7</i>
2.2.2. <i>Signalizacija i stanična komunikacija.....</i>	<i>8</i>
2.2.3. <i>Aminoacil-tRNA-sintetaze kao posrednik u stresnim odgovorima.....</i>	<i>9</i>
2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze i bolesti	11
2.3.1. <i>Povezanost aminoacil-tRNA-sintetaza s neurološkim poremećajima.....</i>	<i>11</i>
2.3.2. <i>Aminoacil-tRNA-sintetaze i tumorske bolesti.....</i>	<i>12</i>
2.4. Zaključak.....	14
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XV

§ Sažetak

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su drevni enzimi koji imaju bitnu ulogu u procesu sinteze proteina, gdje kataliziraju vezanje određenih aminokiselina na odgovarajuće tRNA molekule. Uz svoju primarnu funkciju, tijekom evolucije aaRS-ovi su razvili mnoge nekanonske funkcije. Neke od novih funkcija obuhvaćaju regulaciju transkripcije gena, signalizaciju unutar stanice te odgovore na stanični stres. Osim toga, mnoga istraživanja su pokazala kako su aaRS-ovi povezani s raznim bolestima, uključujući tumorske bolesti i neurološke poremećaje. Razumijevanje novih, nekanonskih funkcija aaRS-ova može pridonijeti razvoju novih terapijskih pristupa te se time otvaraju i nove mogućnosti za liječenje raznih bolesti.

§ 1. UVOD

1.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su važni enzimi koji mogu dekodirati genetički kod. Oni omogućuju točnu biosintezu proteina prema genetičkom kodu, katalizirajući esterifikaciju prijenosne RNA (tRNA) molekule s odgovarajućim aminokiselinama. Pretpostavlja se da su se aaRS-ovi razvili tokom ranih faza razvoja života i da su oni već postojali kod posljednjeg zajedničkog pretka (eng. *last universal common ancestor*, LUCA).¹

O njihovoj evoluciji govori hipoteza koja predlaže da su se aaRS-ovi dvaju razreda (I i II) formirali iz jednog zajedničkog gena. Smatra se da je zajednički gen bio čitan iz dva smjera, na način da bi jedan smjer kodirao za prekursore razreda I, a drugi smjer za prekursore razreda II. Čitanje gena u dva smjera pružilo bi interakciju s različitim stranama tRNA molekule, što bi kao za posljedicu imalo razvoj drugačijih sposobnosti ovih dvaju razreda. Tokom vremena ta dva razreda su se samostalno razvijala kroz razne procese te danas imamo za svaki razred specifične domene i mehanizme za prepoznavanje i povezivanje aminokiselina s pripadnim molekulama tRNA.¹

Tijekom evolucije, ovi drevni proteini osim svoje kanonske uloge u translaciji, dobili su i mnogo novih funkcija koje su veoma bitne za razne biološke procese. U zadnjih par desetljeća otkrilo se da aaRS-ovi imaju razne nekanonske uloge izvan translacije poput transkripcije gena, stanične signalizacije, u odgovorima na stres te u raznim bolestima. Istraživanjem novih funkcija aaRS-ova proučila su se djelovanja mehanizama mnogih bolesti što omogućuje razvoj novih, djelotvornijih terapijskih metoda.¹

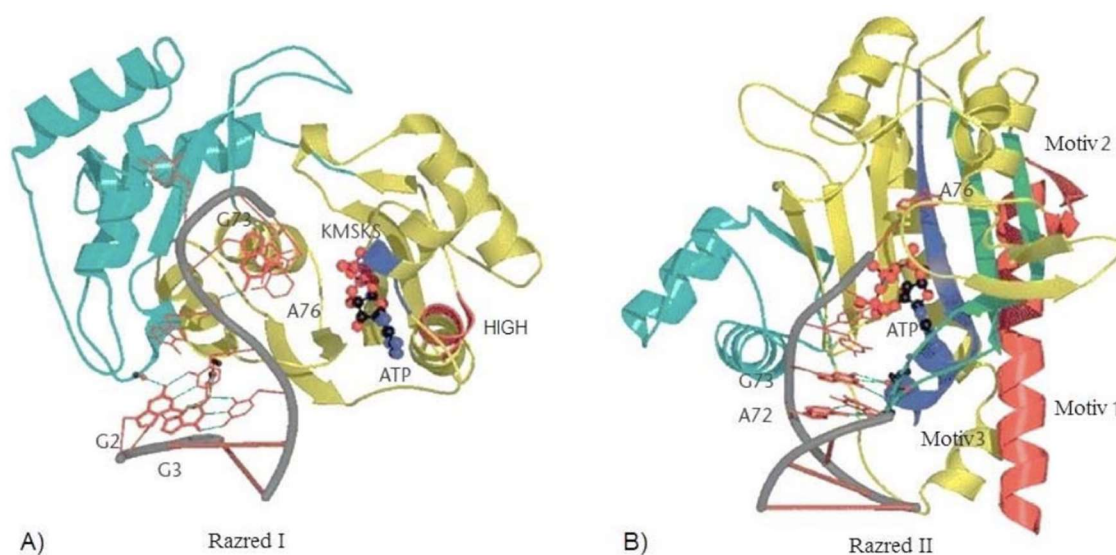
1.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza po klasama

Za svaku od dvadeset proteinogenih aminokiselina postoji jedinstvena aaRS koja katalizira njen prijenos na odgovarajuću molekulu tRNA. Na temelju građe njihovih aktivnih mjesta, aminoacil-tRNA-sintetaze podijeljene su u dva temeljna razreda: razred I i razred II. Iznimka kod aaRS-ova je LysRS koji se može pojavljivati u oba razreda. LysRS razreda II tipičan je oblik kod eukariota i nekih bakterijskih organizama, a LysRS razreda I pojavljuje se

kod arheja i ostalih bakterijskih vrsta.² U razredu I najčešće se nalaze sintetaze koje su monomeri, dok predstavnici razreda II češće su homodimeri ili tetrameri.³

Katalitička domena razreda I sastoji se od Rossmannovog nabora koji sadrži HIGH (His-Ile-Gly-His) i KMSKS motive, a sve to zajedno čini strukturu koja se sastoji od peterolančane paralelne β -ploče povezane α -zavojnica. ^{1,2} Obično vežu mali utor akceptorske petlje tRNA te se aminoacilacija provodi na 2'-OH kraju riboze.¹

Domena aaRS razreda II sadrži miješani α/β sastav, gdje je središnji dio formiran od antiparalelnih β -lanaca okruženih α -uzvojnica uz tri dodatna motiva (slika 1). Motiv 1 služi za dimerizaciju, a motivi 2 i 3 vezuju ATP i određene aminokiseline. Svi aaRS-ovi iz razreda II, osim fenilalanil-tRNA-sintetaze, vežu se za veliki utor akceptorske petlje tRNA te aminoaciliraju 3'-OH kraj riboze.²



Slika 1. Prikaz građe aktivnih mjesta aminoacil-tRNA-sintetaza iz dva temeljna razreda. A) Predstavnik razreda I je glutaminil-tRNA-sintetaza. Rossmannova struktura označena je žutom bojom, a motivi HIGH i KMSKS su označeni tamno-plavom i crvenom bojom. B) Predstavnik razreda II je aspartil-tRNA-sintetaza. Tri specifična motiva označena su zelenom, crvenom te tamno-plavom bojom (preuzeto i prilagođeno iz ⁴).

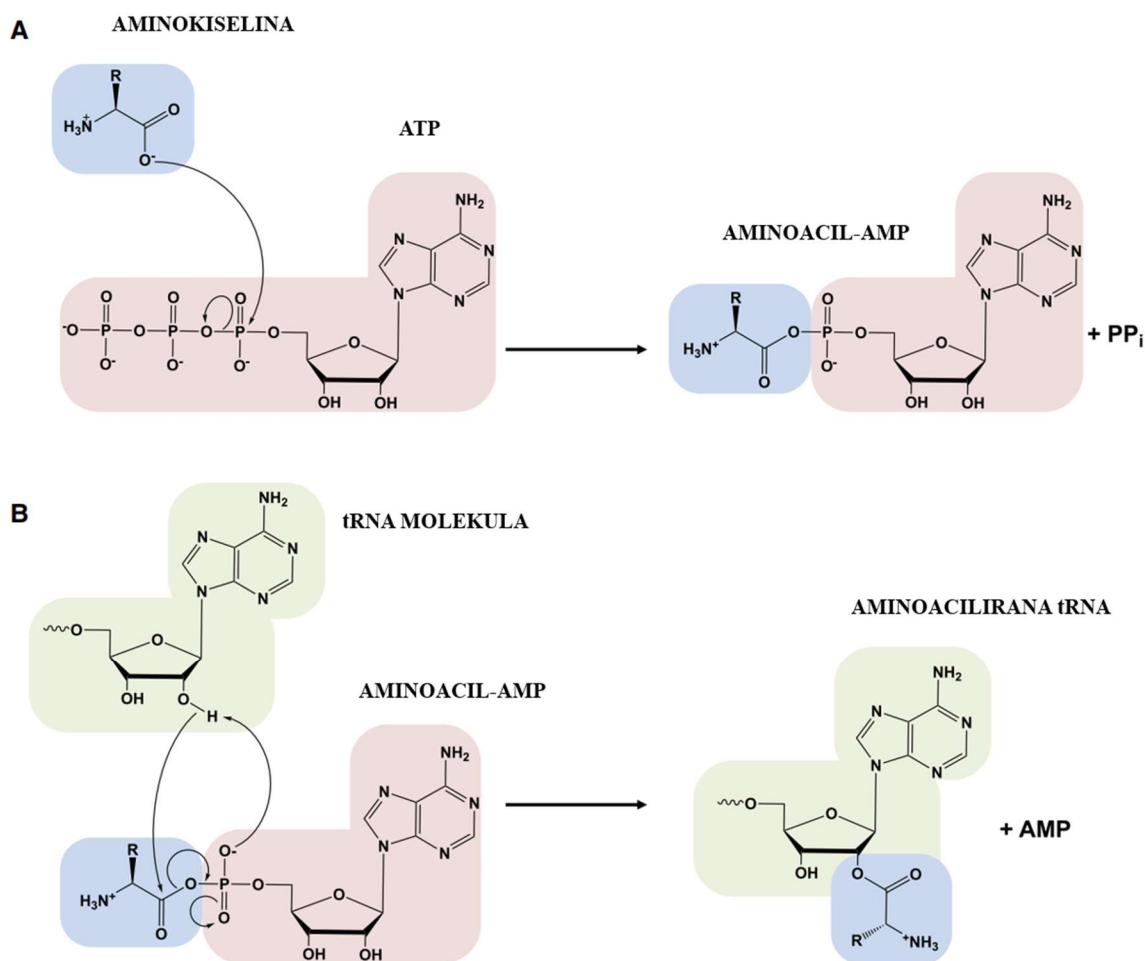
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Osnovne funkcije aminoacil-tRNA-sintetaza

2.1.1. Sinteza proteina: aminoaciliranje tRNA odgovarajućim aminokiselinama

Proces biosinteze proteina u stanicama odvija se kroz dva važna koraka: transkripciju i translaciju. Tijekom transkripcije, genetička informacija pohranjena u molekuli DNA prepisuje se u glasničku molekulu RNA (mRNA). Potom, u fazi translacije ribosomi omogućuju prevođenje genetičkog koda s molekule mRNA u slijed aminokiselina. Na ribosomima se kodon s mRNA sparuje s antikodonom molekule tRNA koja nosi aminokiselinu kodiranu tim kodonom. Taj proces rezultira nastajanjem peptidnih veza između uzastopnih aminokiselina te na taj način nastaju polipeptidni lanci, koji se zatim slažu u specifične proteine.⁴

Primarna zadaća aminoacil-tRNA-sintetaza je kataliziranje vezanja aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA. Ovaj proces naziva se aminoaciliranje i sastoji se od dva koraka. U prvom koraku dolazi do aktivacije aminokiseline na način da se aminokiselina i ATP vežu na katalitičko mjesto enzima.¹ Tada dolazi do nukleofilnog napada atoma kisika iz α -karboksilne skupine aminokiseline na α -fosfatnu skupinu ATP-a te time nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP) i anorganski pirofosfat (PPi), koji se oslobađa.⁴ Iako se ova početna reakcija inače odvija bez prisutnosti molekule tRNA, neke određene aminoacil-tRNA-sintetaze (kao na primjer GlnRS, GluRS, ArgRS i klasa I LysRS) ipak iziskuju njezinu prisutnost kako bi se aktivacija aminokiseline mogla uspješno provesti.¹ U drugom koraku događa se prijenos aktivirane aminokiseline na molekulu tRNA, pri čemu 2'- ili 3'- OH skupina (kod razreda I aaRS-a, prijenos se odvija na 3'-OH skupini, dok se kod razreda II prijenos događa na 2'-OH skupini) riboze adenozina (A76) molekule tRNA vrši nukleofilni napad na α -karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata. Tom reakcijom nastaje esterska veza u aminoaciliranoj tRNA molekuli (aa-tRNA) uz oslobađanje AMP-a (slika 2).⁴ Nastala aa-tRNA sada može prenijeti aminokiselinu na rastući peptidni lanac za sintezu proteina na ribosomu.¹



Slika 2. Prikaz mehanizma reakcije aminoaciliranja. A) U prvom koraku, u aktivnom mjestu enzima, aminokiselina (označena plavo) se aktivira pomoću ATP-a (crveno) te nastaje aminoacil-AMP i anorganski pirofosfat (PP_i), koji se oslobađa. B) Aktivirana aminokiselina se onda prenosi na tRNA molekulu (zeleno), pri čemu se AMP oslobađa (preuzeto i prilagođeno iz ¹).

2.1.2. Mehanizam visoke preciznosti i njegova važnost u translaciji proteina

Da bi se osiguralo točno prevođenje genetičke upute, aaRS moraju detektirati i spariti određene molekule tRNA s njihovim odgovarajućim aminokiselinama, što zahtjeva precizno prepoznavanje oba supstrata.¹ Češće se događa krivi odabir aminokiseline od strane aaRS-a, nego pogrešan odabir tRNA zbog ograničene strukturne raznolikosti mjesta za vezanje aminokiselina u aaRS-ovima.³

Pošto većina molekula tRNA ima relativno sličnu strukturu, moraju postojati elementi koji će omogućavati razlikovanje specifičnih tRNA, a to su elementi identiteta. Svaka stanična tRNA sadrži pozitivne i negativne elemente identiteta. Pozitivni elementi identiteta omogućuju interakciju s odgovarajućim aaRS-om, a negativni sprječavaju vezanje s neprikladnim aaRS-om.⁵ U elemente identiteta najčešće spadaju nukleotidi iz akceptorske peteljke, baza na položaju 73 („diskriminatorska baza“) te modificirane nukleotidne baze.⁴ Nukleotidi koji se nalaze u antikodonskoj petlji također mogu tvoriti elemente identiteta, osim kod nekih tRNA specifičnih za aminokiseline koje su kodirane s više kodona u genetičkom kodu. U tom slučaju nije moguće uspostaviti univerzalni element identiteta.⁵

Aminokiseline su mali supstrati i njihovo prepoznavanje odvija se uz pomoć specifičnih aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu aaRS. Neke među njima imaju vrlo slične strukturne i kemijske karakteristike, što otežava njihovo učinkovito razlikovanje od strane aaRS-a. Iz tog razloga neke aaRS češće aktiviraju krivu aminokiselinu. Na primjer, aromatske aminokiseline fenilalanin (Phe) i tirozin (Tyr), imaju veliku strukturnu sličnost, to jest razlikuju se jedino u hidroksilnoj skupini, što predstavlja dosta veliki problem fenilalanil-tRNA-sintetazi koja često zna pogrešno aktivirati tirozin.³

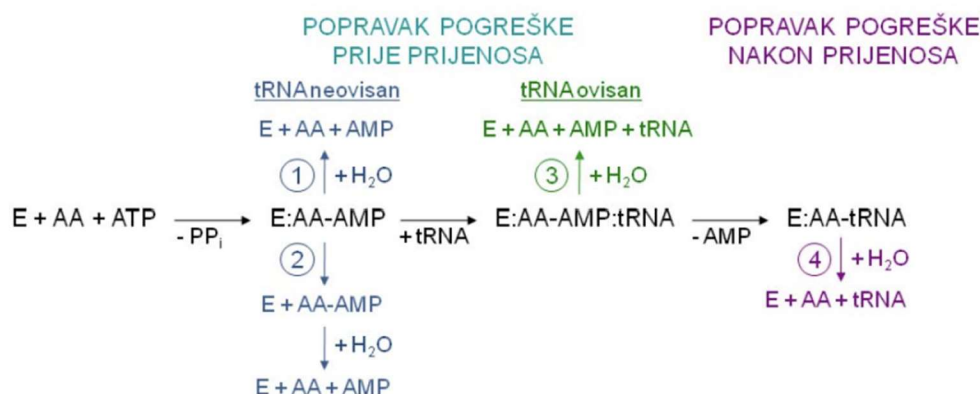
Popravlak aktivacije pogrešne aminokiseline može se događati prije drugog koraka reakcije aminoaciliranja, to jest prije prijenosa aktivirane aminokiseline na određenu molekulu tRNA ili poslije prijenosa. Obično se događa kada je konstanta specifičnosti k_{cat}/K_m nepripadajuće aminokiseline tisuću puta manja od one za pripadnu reakciju. Pri tome k_{cat} označava obrtni broj koji opisuje katalitičku aktivnost enzima, dok K_m predstavlja Michaelisovu konstantu.³

Razlikujemo popravlak pogreške prije prijenosa (eng. *pretransfer editing*) koji se odvija hidrolizom neodgovarajućeg aminoacil-adenilata i popravlak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na molekulu tRNA (eng. *posttransfer editing*) koji se odvija hidrolizom pogrešne aminoacil-tRNA.^{2,3}

Popravak pogreške prije prijenosa može se podijeliti na tri različita mehanizma. Prvi mehanizam je tRNA-neovisni popravak, koji katalizira sama sintetaza u aminoacilacijskom sintetskom mjestu enzima. Drugi se također naziva tRNA-neovisni popravak u kojem se pogrešno sintetizirani intermedijer otpušta, a potom se nestabilna anhidridna veza intermedijera neenzimski hidrolizira u otopini. A treći mehanizam uključuje tRNA-ovisnu hidrolizu krivog aminoacil-adenilata unutar sintetskog mjesta, odnosno unutar istog mjesta gdje je taj spoj i nastao (slika 3).^{2,3}

Popravak pogreške nakon prijenosa aktivirane aminokiseline na odgovarajuću tRNA molekulu događa se kod mnogih aaRS enzima koji imaju specifičnu domenu za popravak, to jest oni imaju dodatno (hidrolitičko) katalitičko mjesto. Postoje dva različita mehanizma: popravak pogreške *in cis* i popravak pogreške *in trans*. Popravak pogreške *in cis* uključuje prebacivanje, to jest translokaciju jednolančanog 3' terminalnog CCA slijeda aminoacilirane tRNA iz sintetskog mjesta u domenu za popravak. Da bi 3'-kraj tRNA, zajedno s pogrešno vezanom aminokiselinom mogao stići do drugog katalitičkog mjesta, mora se najprije odvojiti iz sintetskog aktivnog mjesta, što uzrokuje konformacijske promjene kompleksa aaRS: aa-tRNA. Ovo premještanje poznato je pod imenom translokacija, a završava smještanjem esterske veze neprikladne aminoacil-tRNA u hidrolitičko aktivno mjesto. Tamo se neprikladna aa-tRNA hidrolizira bez disocijacije cijele aa-tRNA te se nakon toga nenabijena tRNA i slobodna aminokiselina oslobađaju iz enzima.^{2,3} Istraživanjem struktura sintetaza razreda I dobiveni su dokazi o popravku pogreške *in cis* rendgenskom strukturnom analizom.³

Mehanizam popravka pogreške *in trans* zamijećen je kod raznih aaRS enzima razreda II. Taj mehanizam podrazumijeva disocijaciju i kasniju asocijaciju aminoacilirane tRNA. Tokom translokacije 3'-kraja može se dogoditi da se pogrešno aminoacilirana tRNA odvoji od enzima te se ona onda ponovno veže za aaRS i njenu domenu za popravak pogreške ili u nekim slučajevima za trans-editing faktor, što onda uzrokuje hidrolizu pogrešne aminoacilirane tRNA molekule. Trans-editing faktor je samostalni protein koji se nalazi u citoplazmi.⁶



Slika 3. Ukratko opisana procedura popravka pogreške kod aminoacil-tRNA-sintetaza (preuzeto i prilagođeno iz ⁴).

2.2. Nove funkcije aminoacil-tRNA-sintetaza

Osim njihove kanonske uloge u translaciji, aminoacil-tRNA-sintetaze tijekom evolucije razvile su i sekundarne funkcije.⁷ U posljednja tri desetljeća, biokemijska i genetička istraživanja otkrila su da sintetaze imaju mnogo različitih nekatalitičkih, regulacijskih funkcija, od regulacije gena do različitih biosintetskih aktivnosti.¹

2.2.1. Regulacija transkripcije gena putem humane seril-tRNA-sintetaze: primjer regulacije gena VEGFA

Seril-tRNA-sintetaze (SerRS) su enzimi koji prvenstveno kataliziraju vezanje aminokiseline serin na odgovarajuću tRNA, što je važan korak u biosintezi proteina. Osim svoje kanonske uloge u translaciji, SerRS iskazuje i svoje nekakonske funkcije, obuhvaćajući regulaciju transkripcije gena. To ima značajan utjecaj na procese kao što su angiogeneza i razvoj krvnih žila.⁸

Jedan od bitnijih primjera nekanonskih funkcija je značajka humane citosolne SerRS u regulaciji transkripcije gena za vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGFA), koji je važan za angiogenezu. U normalnim uvjetima, SerRS se ponaša kao negativni regulator ekspresije gena VEGFA. Kada se SerRS unese u jezgru, tamo formira kompleks s YY1 i SIRT2, koji konkurira

s aktivirajućim transkripcijskim faktorima NF κ B1 i c-Myc. Kao rezultat smanjuje se ekspresija VEGFA, što je bitno za provođenje pravilnog razvoja krvnih žila i angiogeneze.⁸

Kontrola ove funkcije SerRS-a podvrgnuta je raznovrsnim staničnim signalima. Tokom hipoksije, stanja smanjenje koncentracije kisika u stanicama i tkivu, fosforilacija SerRS-a smanjuje njegovo vezivanje za promotor VEGFA gena, dok nedostatak hranjivih tvari dovodi do glikolizacije SerRS-a, čime se smanjuje njegova lokalizacija u jezgri. Navedeni posttranslacijski modifikacijski mehanizmi osiguravaju efikasnu regulaciju ekspresije VEGFA u odgovoru na promjene u staničnom prostoru. Navedena regulacijska uloga u ekspresiji VEGFA smatra ga budućim terapijskim ciljem za liječenje angiogeneze i kardiovaskularnih bolesti.⁸

2.2.2. Signalizacija i stanična komunikacija

Aminoacil-tRNA-sintetaze su enzimi koji osim svoje primarne uloge imaju i ključnu ulogu u signalizaciji i staničnoj komunikaciji, djelujući kao senzori promjena u staničnom okruženju.^{9,10} Promjene u staničnom okruženju mogu biti izazvane oksidacijskim stresom, prisutnošću toksičnih tvari ili nekih drugih štetnih okolnosti. Pri takvim promjenama aaRS enzimi prolaze kroz brojne posttranslacijske modifikacije kao što je na primjer fosforilacija. Pri tome se aaRS enzimima mijenja njihova funkcija te oni onda mogu djelovati kao signalne molekule. Ukratko, aktivirani aaRS-ovi mogu ući unutar stanice, gdje međudjeluju s različitim signalnim proteinima, pri čemu pokreću brojne signalne puteve. Na taj način oni sudjeluju u mnogim biološkim procesima, pomažući stanici na prilagodbu tokom promjene stanične okoline.⁹

Najučestalija posttranslacijska modifikacija koja se pojavljuje kod aaRS enzima jest fosforilacija. U višim eukariotima aaRS proteini obično su dio multi-tRNA-sintetaznog kompleksa (MSC). Fosforilacija i disocijacija aminoacil-tRNA-sintetaza iz multi-tRNA-sintetaznog kompleksa određuju važne mehanizme pomoću kojih one kontroliraju različite stanične zadaće, poput imunološkog odgovora i obranu od raznih infekcija. MSC je kompleks koji se nalazi u citoplazmi te se sastoji od devet zasebnih aaRS-ova (GluProRS, AspRS, IleRS, LysRS, LeuRS, MetRS, GlnRS, ArgRS) i tri pomoćna proteina poznata kao aaRS-interaktivni multifunkcionalni proteini (AIMP1, AIMP2, i AIMP3). Taj kompleks ima ulogu skladišnog mjesta u kojem se enzimi i pomoćni proteini pridržavaju u spremnom stanju unutar stanice, no

nisu uvijek aktivni. Oni se aktiviraju kada je stanici potreban specifičan odgovor, na način da se određeni enzimi ili proteini otpuštaju iz MSC kompleksa te onda kao takvi obavljaju specifične regulatorne funkcije.¹⁰

Glutamil-prolil tRNA-sintetaza (GluProRS) je primjer bifunkcionalnog enzima među aaRS-ovima, koji se nalazi kao dio MSC kompleksa te koji može biti fosforiliran na određenim serinskim ostacima kao odgovor na interferon-gama (IFN- γ). Prilikom odgovora na stimulaciju interferonom-gama, GluProRS prolazi kroz fosforilaciju na dva karakteristična serinska ostatka: Ser886 i Ser999. Ciklin-ovisna kinaza 5 (CDK5) uzrokuje fosforilaciju na Ser886, a fosforilaciju na Ser999 inducira neka druga kinaza koja je aktivirana od strane IFN- γ . Spomenute fosforilacije uzrokuju konformacijske promjene u strukturi enzima te one omogućuju njegovu disocijaciju iz MSC kompleksa. Disocirani GluProRS onda sudjeluje u stvaranju GAIT kompleksa (eng. *IFN- γ -activated inhibitor of translation complex*, IFN- γ -aktiviran inhibicijski kompleks translacije) koji je heterotetramerni kompleks. Formirani GAIT kompleks potom se veže na određene sekvence unutar 3'-netranslatirajućih regija (3'-UTR) molekula mRNA. Vezanjem GAIT kompleksa na dotične regije inhibira se inicijacija translacije molekula mRNA koje su uključene u akutne upalne procese. Na taj način GluProRS sprječava proizvodnju upalnih proteina koji mogu dovesti do akutne upale i oštećenja tkiva. Navedeni mehanizam je bitan za kontrolu upalnih odgovora te djeluje kao regulacijski mehanizam koji pomaže u održavanju homeostaze u stanici.¹⁰

2.2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze kao posrednik u stresnim odgovorima

Kada su stanice pod stresnim okolnostima one aktiviraju integrirani stresni odgovor (ISR), koji globalno smanjuje razinu translacije i aktivira gene povezane sa stresom kako bi se omogućilo stanično preživljavanje. Jedan od bitnijih mehanizama koji se tada koristi je fosforilacija eukariotskog inicijacijskog faktora eIF2 α , kojim se reducira sinteza proteina to jest translacija. Premda je ISR poglavito odgovoran za reakciju stanica na stres, nije uvijek idealan za rješavanje intenzivnog stresa.¹¹

Aminoacil-tRNA-sintetaze su kroz evoluciju (osim svoje primarne uloge) zadobile i sposobnost da djeluju kao posrednici u staničnim stresnim odgovorima. Pri raznim stresnim okolnostima kao što su oksidacijski stres, stres endoplazmatskog retikuluma (ER) ili tijekom gladovanja, neki aaRS enzimi mijenjaju svoju lokalizaciju unutar stanice to jest dolazi do

translokacije. Taj proces translokacije ima bitnu ulogu u regulaciji ekspresije gena koji su povezani s odgovorima na stres.¹²

Najistraženiji aaRS enzim koji pokazuje vještinu da djeluje kao posrednik u odgovoru na stres je tirozil-tRNA-sintetaza (TyrRS). Pod određenim stresnim okolnostima on se može translocirati u jezgru gdje onda pokreće mehanizme popravka koji štite stanicu od oštećenja DNA te pruža stanici šansu za prilagodbu u uvjetima dužeg i intenzivnijeg stresa.^{11,12}

Translokacija TyrRS je regulirana uz pomoć posebnog signala za nuklearnu lokalizaciju (NLS) unutar enzima. Navedeni signal također dijeli mjesto s dijelom enzima koji se veže za molekulu tRNA. U normalnim okolnostima, kada je TyrRS vezan za tRNA, enzim ostaje u citosolu i NLS signal je prikriven. Tokom stresnih okolnosti, enzimi kao što su angiogenini cijepaju molekule tRNA te ih fragmentiraju te onda one više nisu pristupačne za vezanje s TyrRS enzimom. Pošto nema vezanja, signal za nuklearnu lokalizaciju nije prekriven te on omogućava TyrRS-u da se prebaci iz citosola u jezgru stanice.¹¹

Glavna uloga TyrRS, nakon što uđe u jezgru, je inhibicija translacije. Ta inhibicija obuhvaća transkripcijsku represiju određenih gena koji su povezani s translacijom. Enzim TyrRS djeluje tako da dovodi transkripcijske ko-represore TRIM28 i kompleks NuRD do specifičnih gena unutar jezgre stanice. Oni modificiraju epigenetski status tih gena, točnije modificiraju kako je DNA složena i raspoloživa za transkripciju, ali ne mijenjajući samu sekvencu DNA. Na taj način, preko epigenetskih mehanizama koji reguliraju DNA, enzim TyrRS uz TRIM28 i kompleks NuRD kontrolira koji će se geni "uključiti" ili "isključiti" u odgovoru na neku stresnu situaciju. Represijom tih gena smanjuje se sinteza proteina u stanicama te se time sprječava nekontrolirano nakupljanje štetnih proteina koji nastaju pod uvjetima intenzivnog stresa.¹¹ TyrRS djeluje kao glavni regulator stanične homeostaze održavajući ravnotežu između opstanka i kontrole translacije.¹¹

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze i bolesti

2.3.1. Povezanost aminoacil-tRNA-sintetaza s neurološkim poremećajima

Posljednjih godina otkrivene su mnoge mutacije u genima koje kodiraju aaRS enzime koje mogu dovesti do raznovrsnih neuroloških poremećaja.¹³ Najnovija istraživanja pokazala su da je otprilike 10 citosolnih i 14 mitohondrijskih aaRS enzima usko povezano s nekim oblikom poremećaja živčanog sustava.¹⁴ Neki od najčešćih poremećaja središnjeg i perifernog živčanog sustava su Charcot-Marie-Tooth (CMT) bolest i leukoencefalopatija.

Charcot-Marie-Tooth bolest je nasljedni poremećaj perifernog živčanog sustava koji je karakteriziran polaganim slabljenjem mišića te na kraju i atrofijom udova. Uzrok ove bolesti su mutacije u nekoliko određenih citosolnih aminoacil-tRNA-sintetaza kao što su GlyRS, TyrRS, AlaRS i MetRS.¹⁴ Prve mutacije u genu koje su povezane s CMT-om su glicil-tRNA-sintetaza (GlyRS). Mutacije poput E71G i L129P u GlyRS izazivaju gubljenje osnovne funkcije enzima na način da se smanjuje njegova zadaća za aminoaciliranjem tRNA molekule, pri čemu onda dolazi do nakupljanja neispravnih proteina i time do oštećenja neurona. Kod mutacija u tirozil-tRNA-sintetazi (TyrRS) također se javlja smanjena mogućnost aminoaciliranja te to kao za posljedicu uzrokuje pogrešnu lokalizaciju enzima na aksonskim završecima, što može izazvati degeneraciju neurona. Uz navedene mutacije, postoje još i mutacije u alanil-tRNA-sintetazi (AlaRS) i metionil-tRNA-sintetazi (MetRS) koje također uzrokuju slične promjene koje rezultiraju smanjenom enzimskom aktivnošću.¹⁴

Leukoencefalopatija je heterogena skupina poremećaja koji zahvaćaju središnji živčani sustav, a popraćeni su gubitkom bijele tvari u mozgu.¹⁴ Najčešće je popraćen simptomima kao što su poteškoće u kretanju, cerebelarnom ataksijom te kognitivnim padom.¹⁴ Vrlo je rijedak neurološki poremećaj kojeg uzrokuju mutacije unutar eksona 3 i 5 gena za mitohondrijsku asparaginil-tRNA-sintetazu (AspRS). One mogu utjecati na uobičajeno prekrajanje pre-mRNA, pri čemu može doći do preuranjene terminacije translacije ili preskakanja eksona. Navedeni poremećaji u sintezi proteina mogu ugroziti funkcionalnost nekih mitohondrijskih enzima i proteina koji su uključeni u neke druge metaboličke putove, poput oksidacijske fosforilacije. Oksidacijska fosforilacija je metabolički put u kojem se proizvodi većina stanične energije u obliku ATP-a. Kada je ona poremećena, stanice se moraju osloniti na alternativni izvor energije,

a to je anaerobna glikoliza. Nusprodukt anaerobne glikolize je laktat, koji se u ovom slučaju akumulira u tkivima zbog mutacija u AspRS-u.¹³ Navedene promjene uzrokuju akumulaciju laktata u organizmu, što služi kao klinički marker ovog poremećaja.¹³

2.3.2. *Aminoacil-tRNA-sintetaze i tumorske bolesti*

Suvremena istraživanja otkrila su da aminoacil-tRNA-sintetaze imaju i ključnu ulogu u kontroli staničnih mehanizama koji su povezani s razvojem i progresijom tumora. Otkriveno je da one mogu sudjelovati u uspostavljanju proliferativnih signala, koji su bitni za nekontrolirani rast tumorskih stanica. Također je otkriveno da one sudjeluju u procesu deregularizacije stanične energije, koji osigurava tumorskim stanicama da prežive u nepovoljnim uvjetima. Ove dvije bitne funkcije uz još mnogo ostalih, čine aaRS-ove ključnim faktorima u tumorigenezi te time se otvara i mogućnost za razvoj novih pristupa i terapija u borbi protiv karcinoma.¹⁵

Jedna od bitnijih funkcija aaRS-ova u tumorigenezi je njihova mogućnost da mogu regulirati proliferativne signale. Kada su geni za aaRS-ove previše eksprimirani to jest kada je količina aaRS povećana, onda proces translacije postaje brži i učinkovitiji, a to omogućava tumorskim stanicama brže dijeljenje. Kod određenih aaRS-ova kao što su Glu-Pro-tRNA-sintetaza 1, Leu-tRNA-sintetaza 1 i Met-tRNA-sintetaza 1 može se vidjeti njihova povećana ekspresija, što ukazuje da enzimi imaju raznovrsne uloge u različitim vrstama karcinoma.¹⁵

Na primjer, Glu-Pro-tRNA-sintetaza 1 se povećano eksprimira u raku dojke ovisnom o estrogenu te zbog toga on može djelovati kao regulator proliferacije, na način da podupire tumorski rast kontroliranjem translacije u odgovoru na dobivene hormonske signale. Još jedan aaRS koji pokazuje povišen izražaj u različitim oblicima raka je Leu-tRNA-sintetaza 1. On je ključan za aktivaciju mTORC1 signalnog puta, čija je glavna uloga regulacija staničnog metabolizma vezanog za rast i preživljavanje. Leu-tRNA-sintetaza 1 potiče staničnu proliferaciju tako što reagira na visoke razine aminokiseline leucina, koja aktivira mTORC1 signalni put te se na taj način potiče rast tumorskih stanica.¹⁵

Pošto aaRS-ovi imaju mnogo posttranslacijskih modifikacija i različitih se ekspimiraju u karcinomima, imaju veliki potencijal da postanu dijagnostički biomarkeri za tumore. Navedene promjene kroz koje prolaze aaRS-ovi mogu dati puno bitnih informacija o stadiju i tipu raka te čak i budućoj učinkovitosti terapija na određene karcinome. Zbog svojih brojnih funkcija u tumorigenezi, aaRS-ovi pokazuju veliki terapijski potencijal. Primjerice, uvidjelo se

da inhibicija katalitičkih aktivnosti spomenutog Leu-tRNA-sintetaza 1 služi kao djelotvorna strategija kod sprječavanja rasta tumora otpornih na standardne terapije. Puno istraživanja se trenutno usredotočuje na temeljnijem razumijevanju aaRS-ova u staničnom metabolizmu, proliferaciji i staničnom preživljavanju u svrhu otkrivanja novih mogućnosti liječenja pacijenata s različitim vrstama tumora.¹⁵

2.4. Zaključak

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji su kroz evoluciju i razne transformacije pokazali kako osim svoje primarne uloge u sintezi proteina imaju i ključne uloge u regulaciji raznih staničnih procesa. Njihove brojne nekanonske funkcije, koje uključuju signalne i regulacijske uloge u stanicama, kao i njihova povezanost s bolestima poput neuroloških poremećaja i tumora, čini ih važnim predmetom u mnogim biomedicinskim istraživanjima. Proučavanje njihovih novih uloga može dovesti do razvoja naprednih terapijskih strategija, što bi moglo uvelike pomoći pri liječenju raznih bolesti.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. M. Angel, R. Gomez, M. Ibba, Aminoacyl-tRNA synthetases, **26** (2020) 910-926.
2. A. Crnković, Dinamika sklapanja aminoacil-tRNA-sintetaznog kompleksa, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 9-14.
3. I. Stojan, Provjera kontrole kvalitete reakcije aminoaciliranja, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 1-6.
4. M. Biluš, Mehanizam diskriminacije prirodnih proteinogenih i neproteinogenih neprirodnih aminokiselina kod aminoacil-tRNA-sintetaza razreda 1A, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 1-20.
5. R. Giege, M. Sissler and C. Florentz, Nucleic Acids Research **26** (1998) 5017-5035.
6. [Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity - PubMed \(nih.gov\)](#) (datum pristupa 13. kolovoza 2024.)
7. A. C. Mirando, C. S. Francklyn, K. M. Lounsbury, Regulation of Angiogenesis by Aminoacyl-tRNA Synthetases, **15** (2014) 23725-23748.
8. M. Dulic, V. Godinic-Mikulcic, M. Kekez, V. Evic, J. Rokov-Plavec, Protein-Protein Interactions of Seryl-tRNA Synthetases with Emphasis on Human Counterparts and Their Connection to Health and Disease, **14,124** (2024)
9. P. Yoa, P. L. Foxb, Aminoacyl-tRNA synthetases in cell signaling, **48** (2020) 243-268.
10. E.-Y. Leea, S. Kimb,c, M. H. Kim, Aminoacyl-tRNA synthetases, therapeutic targets for infectious diseases, **154** (2018) 424–434.
11. [Nuclear translocation of an aminoacyl-tRNA synthetase may mediate a chronic “integrated stress response”](#): *Cell Reports* (datum pristupa: 19. kolovoza 2024)
12. J. A. Jones, Evaluating the Stress Response and Metabolic Regulation of Aminoacyl-tRNA Synthetases, Doktorski rad, The Schrippts Research Institute La Jolla, California, May 2024, str. 2-20.
13. S. G. Park, P. Schimmel, S. Kim, Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease, **105**, 32 (2008) 11043–11049.
14. J. Ognjenović, M. Simonović, Human aminoacyl-tRNA synthetases in diseases of the nervous system, **15** (2018) 623–634.
15. Y. Sung, I. Yoon, J. M. Han, S. Kim, Functional and pathologic association of aminoacyl-tRNA synthetases with cancer, **54** (2022) 553 – 566.