

# Strukturalna raznolikost Seril-tRNA sintetaza

---

Muždalo, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

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:217:856972>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**STRUKTURALNA RAZNOLIKOST SERIL-tRNA SINTETAZA**

**STRUCTURAL DIVERSITY OF SERYL-tRNA SYNTHETASES**

**SEMINARSKI RAD**

Anja Muždalo  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
Undergraduate study of molecular biology  
Mentor: Ivana Weygand uraševi

Zagreb, 2009.

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	3
<b>2</b>	<b>Bakterijski tip SerRS</b> .....	5
2.1	Struktura SerRS eubakterije <i>T. thermophilus</i> .....	5
2.2	Struktura SerRS <i>E. coli</i> .....	9
<b>3</b>	<b>Arhealno/eukariotski tip SerRS-a</b> .....	10
3.1	Struktura SerRS-e <i>Pyrococcus horikoshii</i> .....	10
3.2	Interakcije sa seril-adenilatom i ATP-om .....	12
3.3	Interakcija s tRNA <sup>Ser</sup> .....	13
<b>4</b>	<b>Mitohondrijski tip SerRS</b> .....	15
4.1	Struktura mt SerRS goveda, <i>Bos taurus</i> .....	16
4.1.1	Usporedba s poznatom bakterijskom strukturom .....	16
4.2	Mehanizam prepoznavanja mt tRNA <sup>Ser</sup> .....	17
<b>5</b>	<b>Metanogeni tip SerRS</b> .....	20
5.1	Struktura SerRS metanogene arheje <i>Methanosarcina barkeri</i> .....	20
5.2	Vezno mjesto za ATP .....	21
5.3	Vezno mjesto za serin .....	22
5.4	Interakcije s tRNA <sup>Ser</sup> .....	23
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b> .....	25
<b>7</b>	<b>SAŽETAK</b> .....	27
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b> .....	28

# 1 UVOD

Aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS) igraju središnju ulogu u prevo enju geneti kog koda jer kataliziraju povezivanje odgovaraju ih parova aminokiselina i molekula tRNA na temelju trodimenzijskih stereo-specifi nih karakteristika svojih supstrata. Aminoaciliranje se odvija u dva koraka – u prvom se koraku aminokiselina aktivira s ATP-om pri emu aminoacil-adenilat ostaje vezan na enzimu uz osloba anje pirofosfata, dok se u drugom koraku aminoacil prebacuje na 3' (klasa II) ili 2' (klasa I) krajnjeg adenzina tRNA adaptera. Postoji ukupno 20 aaRS (jedna za svaku aminokiselinu) podijeljenih u dvije, ve spomenute, klase koje se me usobno bitno razlikuju u strukturi i mehanizmu reakcije.

Seril-tRNA sintetaze (SerRS) pripadaju klasi II, podklasi IIa (zajedno s AlaRS, ThrRS, ProRS, HisRS i homodimernom GlyRS), ija je kataliti ka domena 7- ili 8-lan ana antiparalelna -plo a te sadržava tri konzervirana motiva (1, 2, 3) (Cusak *et al*, 1990; Eriani *et al*, 1990; Fujinaga *et al*, 1993; Chimnaronk *et al*, 2005.). Za razliku od ve ine aaRS, SerRS ne koristi antikodon kao glavni identitetni element, što je i razumljivo ako se u obzir uzme postojanje 6 razli itih kodona za serin (UCA, UCU, UCG, UCC, AGU, AGC) pri emu niti jedna pozicija kodona nije konzervirana. Atipini identitetni element tRNA<sup>Ser</sup> jest duga dodatna ruka, koju tako er imaju tRNA<sup>Leu</sup> i bakterijske tRNA<sup>Tyr</sup> (tRNA «tipa 2»). U skladu s time, enzimi SerRS su stekli jedinstvenu N terminalnu domenu za prepoznavanje duge varijabilne ruke (Borel *et al*, 1994; Vincent *et al*, 1995.).

Jedina poznata iznimka jest sustav tRNA<sup>Ser</sup>/SerRS na en u mitohondrijima Metazoa, u kojem je tRNA<sup>Ser</sup> prekrojena na na in da joj nedostaje cijela varijabilna ruka te je shodno tome i na in vezanja na odgovaraju u mt SerRS druk iji.

SerRS se mogu podijeliti na dva osnovna tipa: bakterijski i arhealno-eukariotski. Za bakterijski, ujedno i najistraženiji tip, karakteristi ni su identitetni elementi dodatna ruka tRNA i peteljka akceptora (Normanly *et al*, 1992). Broj baznih parova dodatne peteljke je presudan za aminoaciliranje SerRS *E. coli* (optimalno 5-7), kao i prva 4 bazna para akceptorske peteljke te diskriminatorska baza G73. Spomenute baze su konzervirane me u pet izoakceptorskih tRNA<sup>Ser</sup> *E. coli*; npr. mutacija G2:C71 u C2:G71 drasti no smanjuje afinitet vezanja na enzim (Normanly *et al*, 1992; Asahara *et al*, 1994;).

Eukariotski tip SerRS (ljudski i kvaš ev) prepoznaje tRNA<sup>Ser</sup> na temelju 4 bazna para u peteljci dodatne ruke, koja je kraća od bakterijske. Dodatna i T-peteljka odvojene su s dva bazna para, za razliku od jednog para koji te dvije regije odvaja u bakterijskom tipu SerRS. Bazni parovi u akceptorskoj peteljki nisu konzervirani, dok G73, iako konzerviran, nije bitan za specifičnost interakcije s enzimom (Himeno et al, 1997).

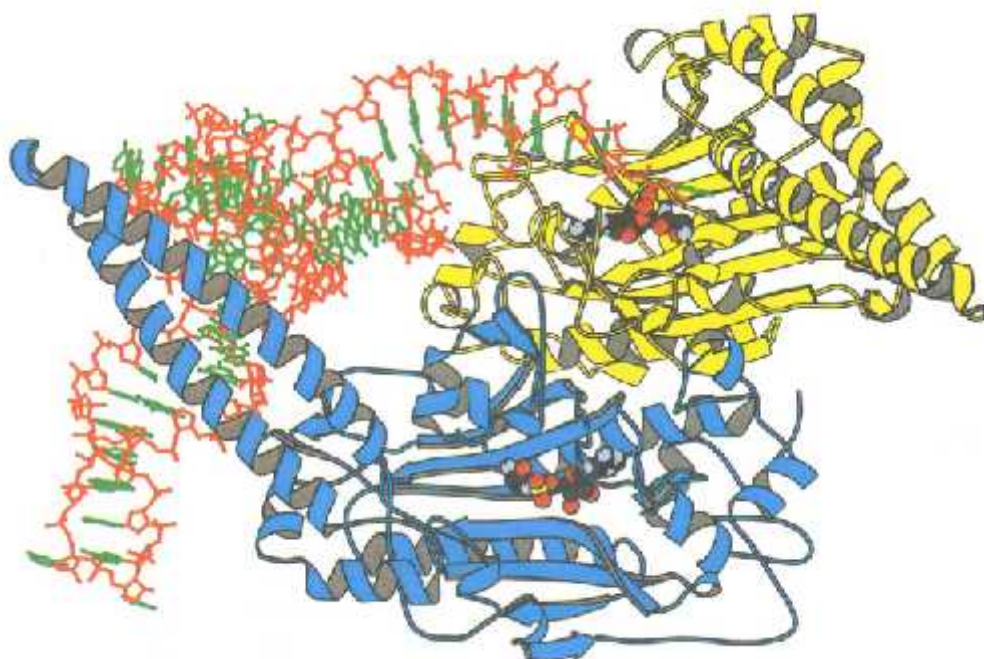
Arhealni tip SerRS dijeli karakteristike oba prije spomenuta tipa, s time da se svrstava u istu grupu s eukariotskim – 4 bazna para u peteljci dodatne ruke, 2 bazna para razdvajaju T- i dodatnu peteljku – s druge strane, prva 4 bazna para akceptorske peteljke su očuvana što je karakteristika bakterijskog tipa (Sprinzl et al, 1998).

U metanogenih arheja iznimno nalazimo metanogeni tip SerRS, bitno drugačiji po arhitekturi N-terminalne domene (nije tipična na bakterijska dvostruka zavojnica), aktivnog mjesta (uključuje kation cinka, Zn<sup>2+</sup>, slično ThrRS) te zbog pojave nekih insercija u katalitičkoj domeni (HTH fold između motiva 1 i 2 te organiziraju a petlja serina između motiva 2 i 3) (Bilokapic et al, 2006).

## 2 Bakterijski tip SerRS

Sustav tRNA<sup>Ser</sup>/SerRS je jedinstven ne samo po specifičnim strukturalnim elementima – helikalnoj ruci sintetaze («coiled-coil») u interakciji s dugom varijabilnom rukom tRNA<sup>Ser</sup> (kao glavnim identitetnim elementom) – već i po načinu poprečnog vezanja tRNA<sup>Ser</sup> preko dimera sintetaze (Biou et al, 1994; Vincent et al, 1995.). Korisno je spomenuti da helikalna ruka N-terminalne domene ne samo da služi kao glavna determinanta za srodnu tRNA<sup>Ser</sup>, već kao i važna antideterminanta za ostale nepripadne tRNA. Mutacije u regiji helikalne ruke dovode do relaksacije specifičnosti te do aminoaciliranja nesrodnih tRNA, iako na niskoj razini. Antikodon, inače ključan identitetni element, nevažan je za SerRS prilikom prepoznavanja pripadne tRNA<sup>Ser</sup>. Sve te opće karakteristike nalazimo i u SerRS eubakterije *Thermus thermophilus*.

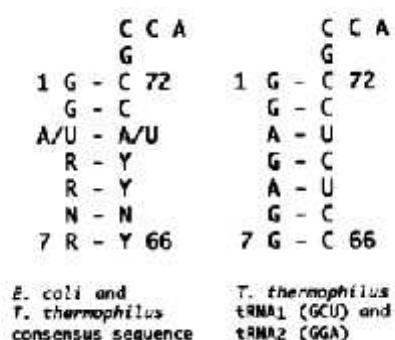
### 2.1 Struktura SerRS eubakterije *T. thermophilus*



**Slika 1.** Prikaz ternarnog kompleksa – SerRS-tRNA<sup>Ser</sup>(GGA)-SerAMS – monomer 1 sintetaze je u žutom (1-421), a monomer 2 u plavom (501-921). Okosnica tRNA je crvena, a baze zelene. Antikodonska peteljka nije prikazana. Duga varijabilna ruka prolazi okomito na helikalnu ruku monomera 2 i izranja u desnom donjem kutu prikaza. Seril adenilat je sferno prikazan u oba aktivna mjesta. (Preuzeto iz: Cusack et al, 1996)

Ekstenzivan kontakt ostvaren je između u okosnice drugog (2.) do šestog (6.) baznog para duge varijabilne ruke i helikalne ruke sintetaze, kao i preko specifičnih interakcija s bazama četvrtog (4.) baznog para malog utora. Sintetazna ruka je također u kontaktu s T- i D-petljama tRNA (Sl.1.) Bitno je i uočiti fleksibilnost helikalne ruke u tRNA nevezanom stanju, te zakretanje i orijentiranje te ruke uslijed vezanja tRNA, na način da se maksimizira kontakt sa supstratom uz istovremeno pozicioniranje akceptorske peteljke u aktivno mjesto (Cusack et al, 1996).

Treba spomenuti i identitetnu sekvencu akceptorske peteljke – čine ju prva tri bazna para, redom G1-C72, G2-C71, A/U3-U/A70, te preferentno purin/pirimidin na pozicijama 4-69 i 5-68 (Sl.2.). Najznačajnija diskriminanta je na položaju 2-71, što možemo zaključiti iz drastičnog pada kinetičkog parametra  $V_{max}/K_m$  (tj. pada u inkovitosti enzima) za mutante C2-G71 i U2-G71, redom, na 0.06 i 0.09 vrijednosti  $V_{max}/K_m$  za divlji tip tRNA<sup>Ser</sup> (Cusack et al, 1996).

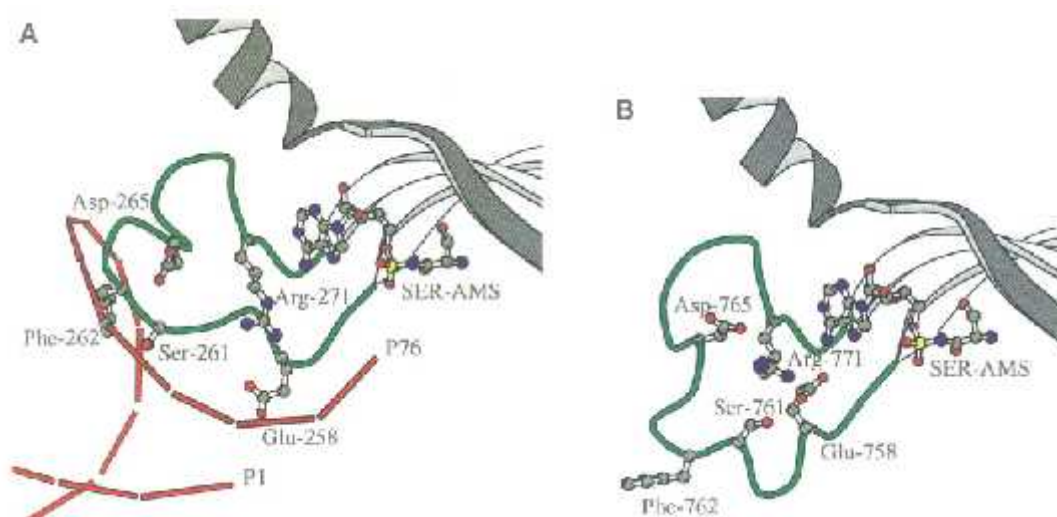


**Slika 2.** Sekvence akceptorskih peteljki tRNA<sup>Ser</sup>. Kratice: R (purin), Y (pirimidin), N (bilo koji nt)

### 2.1.1 Konformacijske promjene uslijed vezanja tRNA

Uslijed vezanja tRNA petlja motiva 2 (258-267 prve, a 758-767 druge podjedinice) doživljava velike konformacijske promjene u odnosu na konformaciju u enzimu koji je vezao samo ATP ili Ser-AMS (seril adenilat, tj. aktivirani serin). Prilikom vezanja tRNA i ulaska akceptorske peteljke u aktivno mjesto jedne od podjedinica dolazi do promjene konformacije petlje motiva 2 te podjedinice – zauzima tzv. T konformaciju. Istovremeno, petlja motiva 2 druge podjedinice ostaje u konformaciji u kojoj jest kada veže ATP/Ser-AMS – A konformaciji. U apo formi

sintetaze, petlja motiva 2 je neure ena. Ključan aminokiselinski ostatak za prijelaz iz A- u T-konformaciju je Glu258 – okreće se za 180° i interagira s N6 adenina (ATP/Ser-AMS-a) u A-konformaciji i N2 G73 (diskriminatorne baze) u T-konformaciji. Ser261 pomaže u pozicioniranju Glu258 u A-konformaciji, ali interagira s G2 u T-konformaciji (Sl.3.). Interakcija petlje motiva 2 (posebice karbonila Phe262 i bojnog ogranka Ser261) s baznim parom 2-71 objašnjava konzerviranost para G2-C71, jer bi neki drugi bazni par smanjio broj mogućih vodikovih veza i uveo akceptore vodika u neposrednu blizinu karbonilnog kisika Phe262. Osim vodikovih veza kao glavnih stabiliziraju ih veza između baza akceptorske peteljke i aminokiselinskih ostataka petlje motiva 2, uočene su i “stacking” hidrofobne interakcije između veza spomenutog Phe262 i pirimidina, C69 i U68. Time je objašnjena konzerviranost pirimidina na 3' kraju tRNA – purinski N7 bi kao akceptor vodika djelovao destabilizirajuće u hidrofobnoj okolini.



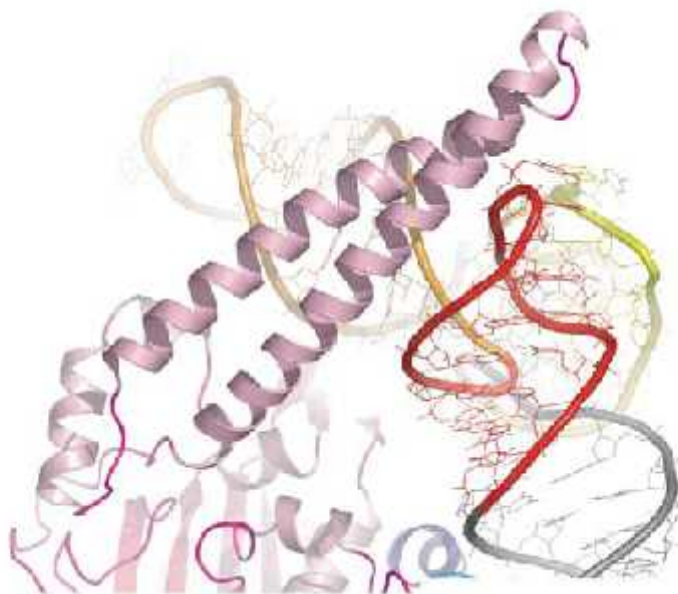
**Slika 4.** Usporedba petlje motiva 2 kada je monomer u (A) T-konformaciji i (B) A-konformaciji. Orijentacije su identične. Prikazani su bojni ogranci ključnih aminokiselinskih ostataka, Ser-AMS u aktivnim mjestima te elementi sekundarne strukture motiva 2 (bijeli lanci, zelena petlja) i 3 (crni lanci i zavojnica u nastavku). Isprekidane crvene linije su pozicije fosfata u tRNA. (Preuzeto iz Cusack et al, 1996)

Osim gore spomenutih aminokiselinskih ostataka, motiv 2 obiluje konzerviranim malim ostacima (Ala, Thr, Val, Gly) koji doprinose fleksibilnosti i reduciraju steričke smetnje prilikom konformacijskih prijelaza. Pretpostavlja se da različite interakcije sa supstratima posredovane petljom motiva 2 uzrokuje prijelaz



aktivnog mjesta iz jedne u drugu konformaciju – uspješno završen korak aktivacije serina potaknut je tako prijelaz iz A- u T-konformaciju. Istovremeno otpuštanje pirofosfata oslobađa Arg271 za interakciju s C74, stabiliziraju u interakciju za 3' tRNA, koja omogućuje nastavak drugog koraka reakcije aminoaciliranja. U tom koraku oslobodi se AMP se vjerojatno otpušta s enzima zbog prebacivanja ključnog Glu258 iz interakcije s N6 adenina u interakciju s diskriminatorskom bazom G73. Konačno, otpušten AMP destabilizira konformaciju petlje motiva 2 te dovodi do otpuštanja aminoacilirane tRNA prije nego što enzim opet veže ATP (ponovno uspostavljaju i stabiliziraju i vodikove veze s adeninom) te ulazi u novi ciklus.

Na temelju strukturalnih podataka možemo zaključiti da se vezanje tRNA<sup>Ser</sup> na SerRS događa u 2 koraka (Biou et al, 1994; Cusack et al, 1996): prvi korak je prepoznavanje i pristajanje na temelju interakcije helikalne regije enzima i duge varijabilne ruke tRNA (S1.5., *proteinski sendvič*), a drugi korak ovisi o ispravnom pozicioniranju 3' kraja tRNA u aktivnom mjestu na temelju uspostave pravilne T-konformacije petlje motiva 2, koja se preferentno uspostavlja u prisustvu adenilata, a ne ATP-a u aktivnom mjestu.



**Slika 5.** Model *proteinskog sendviča* (crvena T-ruka i narančasta varijabilna ruka zarobile su fleksibilnu helikalnu ruku SerRS *T. thermophilus*). (Preuzeto i prilagođeno iz Chimnaronek et al, 2005).

## 2.2 Struktura SerRS *E. coli*

Vrlo je slična SerRS eubakterije *T. thermophilus* – svaka podjedinica homodimernog enzima građena je od N-terminalne domene, 60 Å duga ke dvostruke antiparalelne  $\alpha$ -zavojnice, te C-terminalne domene, 7-lanane antiparalelne  $\beta$ -ploče (Vincent et al, 1995), dio koje jest i aktivno mjesto, strukturalno visoko očuvano izmeću dva enzima. Očuvane su i akceptorske regije izoakceptorskih tRNA *E. coli* (Sl.2.), što dovodi do zaključka da su i mehanizmi oboje dva sustava vrlo slični.

Doduše, postoje dvije razlike – analog aminokiselinskog ostatka Phe262 jest Tyr274, a dodatna hidroksilna skupina je vjerojatno preko molekule vode u interakciji s 67-om fosfatom molekule tRNA (udaljeni su 4.5 Å). Druga razlika je u puno duljoj petlji motiva 1 (Fujinaga et al, 1993) – ona se formira  $\alpha$ -ukosnicu koja interakcijom sa simetrijski odgovarajućim partnerom formira 4-lanani  $\beta$ -ploču – petlja je dovoljno dugačka (za razliku od petlje motiva 1 *T. thermophilus*, 4 aminokiseline) da se ispruži do veznog mjesta za akceptorsku peteljku tRNA druge podjedinice i tu vjerojatno sudjeluje u stabilizaciji okosnice 3' kraja tRNA. To je i potvrđeno strukturalnim analizama, gdje je motiv 1 u kompleksu sa Ser-AMS bio uređen, sa aminokiselinskim ostacima (Asp228-Thr229) u interakciji sa 65. i 66. nt i ekstremitetom (Glu224-Glu225) u interakciji s 1. nt molekule tRNA. Ove dodatne interakcije bi mogle utjecati na konačnu orijentaciju akceptorske peteljke u aktivnom mjestu SerRS *E. coli* u usporedbi sa SerRS *T. thermophilus*.

### 3 Arhealno/eukariotski tip SerRS

Uspješno aminoacilira i bakterijski i arhealni tip tRNA<sup>Ser</sup> (arhealni – Itoh et al, 2008; eukariotski – Soma et al, 1998; Weygand uraševi et al, 1993), dok je istovremeno bakterijski tip SerRS strogo diskriminantan izme u arhealnog i bakterijskog tipa tRNA<sup>Ser</sup> (Tab.1.). Zaključujemo da postoje značajne razlike u načinu interakcije molekula tRNA s bakterijskim i arhealnim tipom SerRS. Npr.  $k_{cat}$  za SerRS *T. thermophilus* pada s  $1.3 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$  za tRNA<sup>Ser</sup> TT na  $0.0022 \pm 0.0010 \text{ s}^{-1}$  za tRNA<sup>Ser</sup> PH (*Pyrococcus horikoshii*), što znači da je katalitička aktivnost enzima smanjena za 3 reda veličine.

**Tablica 1.** Kinetika stacionarnog stanja reakcije aminoaciliranja SerRS arhealnog (*Pyrococcus horikoshii*) i bakterijskog tipa (*Thermus thermophilus*). (Preuzeto i prilagođeno iz Itoh et al, 2008)

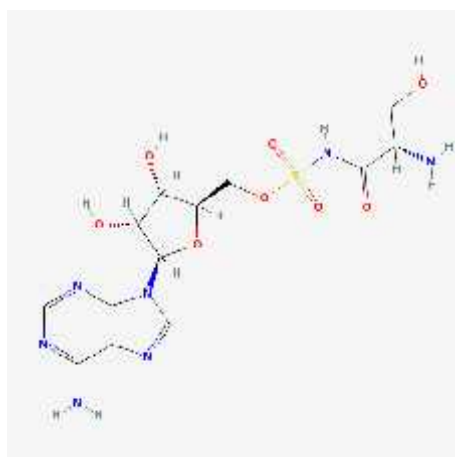
Table 2 The steady-state kinetics of aminoacylation by *P. horikoshii* and *T. thermophilus* SerRSs

SerRS	tRNA <sup>Ser</sup>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ )
<i>P. horikoshii</i>	<i>P. horikoshii</i>	$1.3 \pm 0.3$	$0.33 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.13$
<i>P. horikoshii</i>	<i>T. thermophilus</i>	$1.4 \pm 0.2$	$0.75 \pm 0.09$	$0.55 \pm 0.01$
<i>P. horikoshii</i>	<i>E. coli</i> (UGA)	$2.3 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.4$	$0.43 \pm 0.14$
<i>P. horikoshii</i>	<i>E. coli</i> (GCU)	$5.6 \pm 0.9$	$0.80 \pm 0.22$	$0.14 \pm 0.01$
<i>T. thermophilus</i>	<i>P. horikoshii</i>	$9.8 \pm 0.8$	$0.0022 \pm 0.0010$	$0.00022 \pm 0.00008$
<i>T. thermophilus</i>	<i>T. thermophilus</i>	$1.5 \pm 0.4$	$1.3 \pm 0.1$	$0.91 \pm 0.17$

Each experiment was performed in triplicate, and the  $K_M$  and  $k_{cat}$  values were averaged. The standard errors are shown as values with "±".

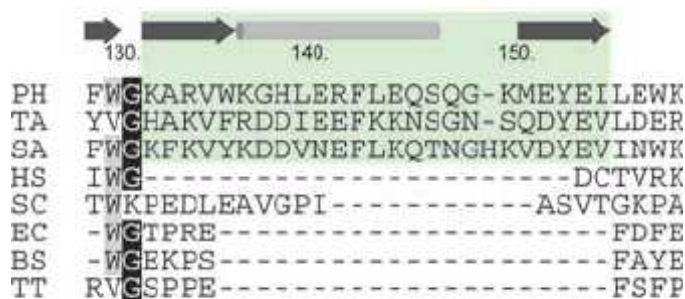
#### 3.1 Struktura SerRS *Pyrococcus horikoshii*

Proteinske strukture SerRS SerSA (Sl.6.), SerRS ATP i apo forme SerRS su približno jednake, uz minimalne RMS (“root mean square”) devijacije atoma glavne osi (Itoh et al, 2008).



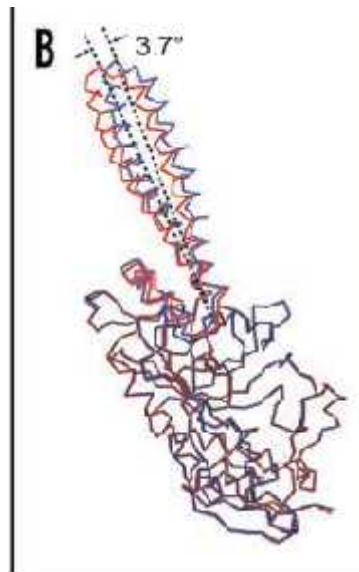
**Slika 6.** 5'-O-[N-(L-seril)-sulfamoil]-adenozin, Ser-SA, nehidrolizabilni analog Ser-AMP (preuzeto iz <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=445736&width=400&height=400>)

Enzim od 455 aminokiselina gra en je od globularne C-terminalne domene (106-455) i N-terminalne helikalne domene (1-105) (Sl.9.). Srž globularne domene tipa je široka antiparalelna  $\beta$ -plo a karakteristična za aaRS klase II, dodatno obogaena dvjema  $\alpha$ -zavojnica i arhealno specifičnom insercijom (131-158). Insercija je graena od 2-lanane antiparalelne  $\beta$ -plo e i kratke  $\alpha$ -zavojnice te se ne pojavljuje u strukturama bakterijskih ni eukariotskih SerRS (Sl.7.) Sura uje s antiparalelnom  $\beta$ -plo om klase II te motivom 2 katalitičke domene u izgradnji bazi nog kanala koji vodi u aktivno mjesto.

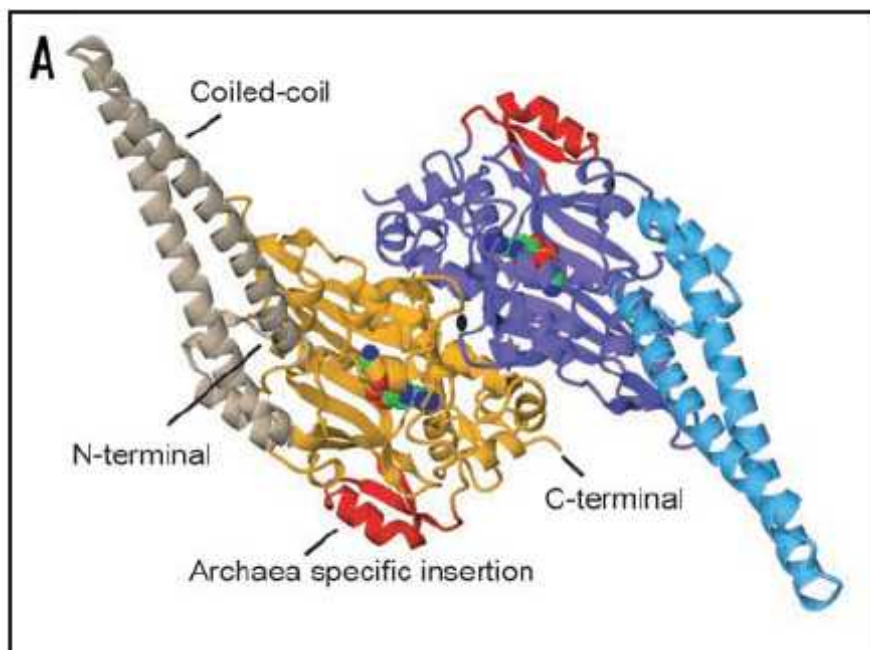


**Slika 7.** Primarni aminokiselinski sljedovi poravnati na temelju strukture – regija arhealno specifične insercije (131-158 SerRS *P. horikoshii*, PH) nedostaje u eukariota i bakterija (Preuzeto i prilagoeno iz Itoh et al, 2008)

N-terminalna helikalna domena sastoji se od tipične dugačke antiparalelne dvostruke  $\alpha$ -zavojnice (“coiled-coil”, 23-105) te dodatne 2 N-terminalne  $\alpha$ -zavojnice (1-22). Superponirane podjedinice gotovo su identične, ali orijentacija helikalne domene u odnosu na globularnu domenu u podjedinici se razlikuje za  $3,7^\circ$  među podjedinicama, što ukazuje na prirodnu fleksibilnost helikalne domene (Sl.8.).



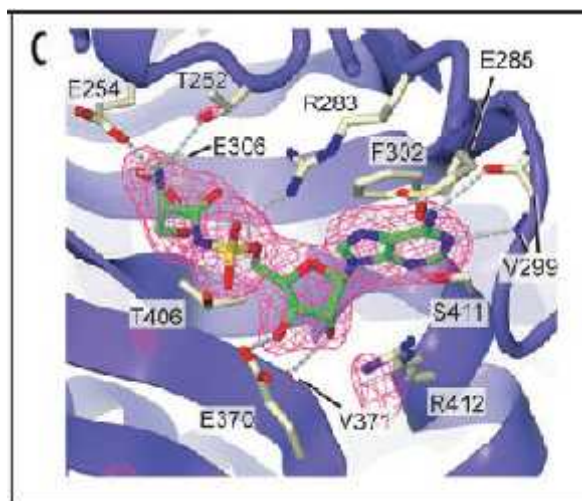
**Slika 8.** Usporedba orijentacija helikalnih domena dvije podjedinice. Globularne domene dviju podjedinica su superponirane (106-455). C-atomi okosnice lanaca A i B su prikazani crvenom i zelenom bojom (Preuzeto i prilagođeno iz Itoh et al, 2008)



**Slika 9.** Struktura SerRS PH s vezanom molekulom Ser-SA. N-terminalna i C-terminalna domena podjedinice A su obojane, redom, bež i narančasto, a podjedinice B svijetlo i tamnoplavo. Arhealno specifična insercija je obojana crveno u obje podjedinice (Preuzeto i prilagođeno iz Itoh et al, 2008)

### 3.2 Interakcije sa seril-adenilatom i ATP-om

Nekoliko strukturalnih elemenata SerRS PH formiraju džep komplementaran molekuli Ser-SA – motiv TXE (252-254), konzervirani motivi 2 (272-310) i 3 (400-438) i  $\beta$ -lanac (367-377) (Sl.10.). Serilni dio interagira s Thr252, Glu254, Glu306, Thr 406, dok je sulfamoil-adenozinski dio supstrata u interakciji Arg283, Glu285, Val299, Glu370, Val371 (glavni lanac) i konzerviranim, u nekih arheja i eukariota, Ser411 koji formira vodikovu vezu s N3 adeninskog prstena, koji je u sendvi u izme u bo njih ogranaka Phe302 i Arg412.



**Slika 10.** Uve ani prikaz aktivnog mjesta SerRS Ser-SA. Iscrtkanim linijama prikazane su mogu e vodikove veze/elektrostatske interakcije s aminokiselinama SerRS (Preuzeto i prilago eno iz Itoh et al, 2008)

### 3.3 Interakcija s tRNA<sup>Ser</sup>

SerRS PH prepoznaje srodnu tRNA na temelju interakcija isklju ivo s dugom varijabilnom rukom što može objasniti široku specifi nost enzima s obzirom na tRNA – jednako u inkovito aminoacilira i tRNA<sup>Ser</sup> *E. coli* i *T. thermophilus*. Prva 4 bazna para akceptorske peteljke su visoko konzervirana, kao i u bakterijskom tipu SerRS, gdje najbitniju ulogu igra 2. bazni par, te je baza G2 koordinirana visoko konzerviranim Ser261 (SerRS TT), koji ima svog analoga Thr288 i u SerRS PH, ali o ito se ne koristi kao u spomenutom bakterijskom mehanizmu prepoznavanja.

SerRS PH sadrži iste konzervirane aminokiselinske ostatke kao i SerRS TT uklju ene u interakciju s dugom varijabilnom rukom tRNA<sup>Ser</sup>, ali ima i dodatne bazi ne ostatke – Arg 41, 49, 51, 398 i Lys 51. Mutacije navedenih aminokiselina uzrokuju smanjenje parametara enzima  $k_{cat}/K_m$  prema arhealnim tRNA<sup>Ser</sup>, ali nemaju

toliki utjecaj na tRNA<sup>Ser</sup> TT te su važnije u prepoznavanju arhealnih tRNA (Itoh et al, 2008). Ipak, najvažnija dva aminokiselinska ostatka su Arg41 (konzerviran i u ostalih domena života, te eventualno zamijenjen lizinom) i Trp40. Arg 41, 49 i 50 aditivno doprinose specifičnosti prepoznavanja, te vjerojatno pojačavaju interakciju s dugom varijabilnom rukom promoviraju i aminoacilaciju (kinetika u odnosu na povećanje  $k_{cat}$  divljeg tipa u usporedbi s trostrukom mutantom, Tab.2.).

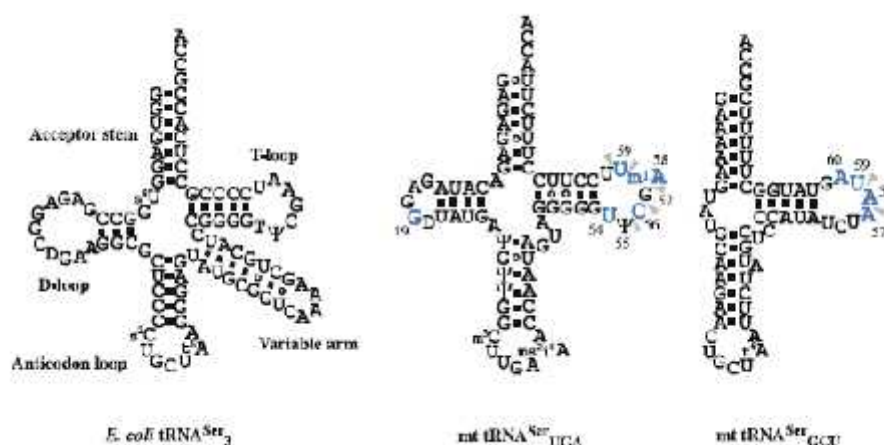
**Tablica 2.** Pad u vrijednostima  $k_{cat}/K_m$  odabranih SerRS mutanata; najveći pad je za trostruku mutantu R41, 49, 50A. (Preuzeto i prilagođeno iz Itoh et al, 2008)

SerRS	tRNA <sup>Ser</sup>	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \mu M^{-1}$ )	Relative
Wild-type	<i>P. horikoshii</i>	1.3 $\pm$ 0.3	0.33 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.13	1
W40A	<i>P. horikoshii</i>	1.9 $\pm$ 0.8	0.13 $\pm$ 0.08	0.060 $\pm$ 0.013	0.19
R41A	<i>P. horikoshii</i>	2.7 $\pm$ 0.9	0.12 $\pm$ 0.07	0.039 $\pm$ 0.010	0.12
R49A	<i>P. horikoshii</i>	1.4 $\pm$ 0.1	0.27 $\pm$ 0.13	0.18 $\pm$ 0.08	0.56
R51A	<i>P. horikoshii</i>	1.2 $\pm$ 0.3	0.20 $\pm$ 0.10	0.17 $\pm$ 0.07	0.54
K396A_R398A	<i>P. horikoshii</i>	1.4 $\pm$ 0.3	0.17 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.04	0.38
R41A,R49A,R51A	<i>P. horikoshii</i>	1.8 $\pm$ 0.2	0.022 $\pm$ 0.010	0.012 $\pm$ 0.006	0.038



## 4 Mitohondrijski tip SerRS

Mnoge mitohondrijske (mt) tRNA Metazoa isti u se zna ajnim strukturalnim odstupanjima od uobi ajene strukture djeteline. (Sprinzl et al, 1998; Helm et al 2000). Primjerice, postoje dvije neuobi ajene tRNA<sup>Ser</sup> u mitohondrijima sisavaca; tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCU</sub> – odgovara AGY (Y = U i C) kodonima – kojoj nedostaje cijela (dihidrouridinska) D-ruka te tRNA<sup>Ser</sup><sub>UGA</sub> – odgovara UCN kodonima (N = A, G, C, U) – koja ima neobi nu konformaciju djeteline uz produženu antikodonsku peteljku. Objema mt tRNA<sup>Ser</sup> nedostaje ina e glavni identitetni element tRNA<sup>Ser</sup> svih carstava života, produžena varijabilna ruka (Sl.11.). Zanimljivo je da je mt SerRS goveda, *Bos taurus*, sposobna prepoznati i razlikovati te dvije neobi ne tRNA<sup>Ser</sup> usprkos tome što ne dijele nikakve identitne sekvence niti sli an strukturalni razmještaj (Yokogawa et al, 2000).



**Slika 11.** Dijagrami sekundarne strukture (prikazani u konfiguraciji djeteline) tipične (*E. coli*) i atipične (mt *B. taurus*) tRNA<sup>Ser</sup>. Zbog nedostatka duge varijabilne ruke u atipičnim izoakceptorima, identitetni elementi “sele” se na T-petlji i označeni su plavom bojom. (Preuzeto i prilagođeno iz Chimnarok et al, 2005).

Identitetni elementi koji osiguravaju prepoznavanje neobičnih tRNA smješteni su u T C-petlji oba izoakceptora, s time da tRNA<sup>Ser</sup><sub>UGA</sub> posjeduje dodatni - karakteristični G19 u D-petlji čija interakcija s C56 stvara novu diskriminantu tj. identitetni element za mt SerRS. Dakle, mehanizam raspoznavanja je drukčiji za dva neobična supstrata (Shimada et al, 2001).



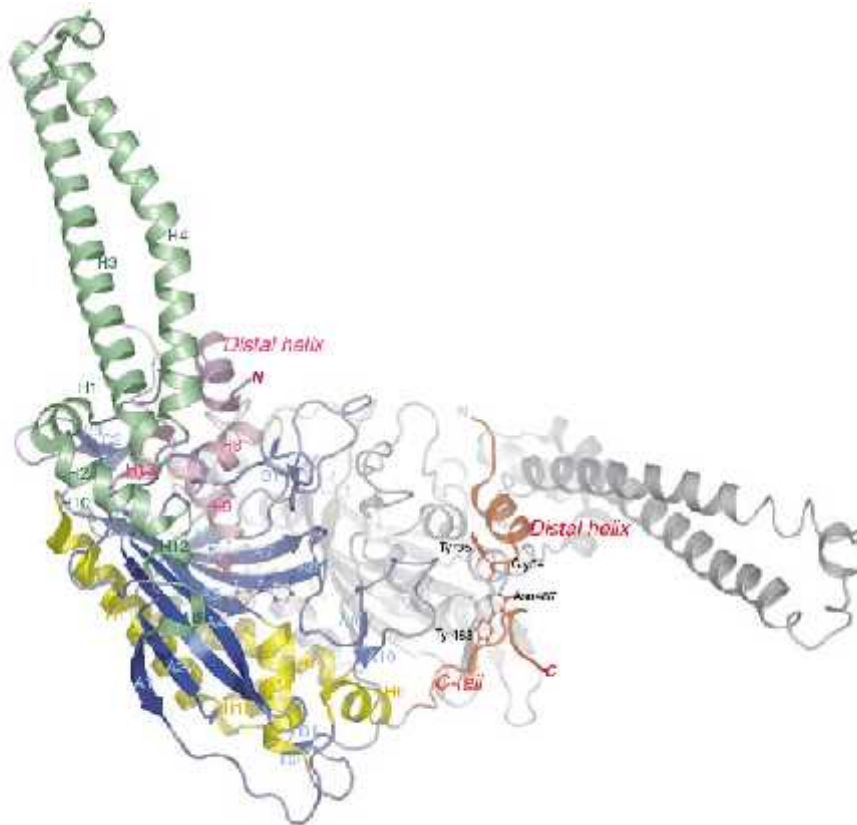
## 4.1 Struktura mt SerRS goveda, *Bos taurus*

Usprkos niskoj o uvanosti primarne sekvence N-terminalne domene enzima u usporedbi s bakterijskim, strukturalno je ona i dalje duga ka -helikalna ruka u obliku ukosnice (Chimnaronk et al, 2005). Duga ka je otprilike 65 Å, a kut koji ini izme u monomera ve i je nego bakterijski, 120°, naspram bakterijskih 90°.

C-terminalna domena s aktivnim mjestom, globularna je domena gra ena oko 8-lan ane -plo e okružene trima helikalnim snopovima.

### 4.1.1 Usporedba s poznatom bakterijskom strukturom

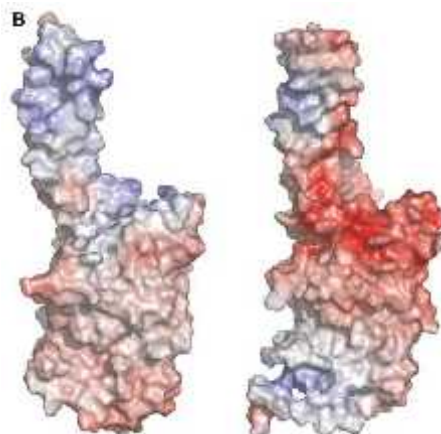
Dva su aminokiselinska produžetka uo ena na oba kraja enzima – N-terminalni produžetak je kratka zavojnica (23-33), tzv. distalni heliks, povezan s prvom zavojnicom H1 u motiv zavojnica-petlja-zavojnica (“helix-loop-helix”) ija je petlja produžena i obujmljuje helikalnu domenu enzima. Distalni heliks, jedinstven je za mitohondrijsku SerRS i ome en je dvama nepromjenljivim argininima s obje strane (Arg24, Arg32) te zajedno sa zavojnicama H8, H9, H13 ini helikalni snop koji se nalazi na “ramenima” molekule (ako su helikalna domena ruke, a globularna tijelo). Drugi produžetak nalazi se na C-kraju, tzv. C-rep, 40 Å duga ka petlja koja se pruža od globularnog tijela molekule. Njezina uloga je u intermolekularnim interakcijama na su elju dvije podjedinice, posebice njezin kratki -lanac koji ini antiparalelnu plo u s odgovaraju om C1 regijom druge podjedinice – na taj na in je fleksibilan C-rep uglavljen u dimernu molekulu mt SerRS. Štoviše, u kristalnoj strukturi je on jako blizu distalnog heliksa druge podjedinice te su ta dva produžetka povezana vodikovim vezama (Sl.12, ozna ene aminokiseline). Poravnate primarne sekvence SerRS ukazale su na C-terminalne produžetke i u eukariotskih enzima, za koje se pretpostavlja da tako er djeluju stabilizacijski pove avaju i dodirnu površinu izme u dvije podjedinice na na in upravo prezentiran na primjeru mt SerRS.



**Slika 12.** 3D prikaz strukture mt SerRS *Bos Taurus*. Različitosti su obojeni  $\alpha$ -helikalni snopovi i  $\beta$ -ploče. Distalni heliks monomera 2 i C-rep monomera 1 obojeni su crveno, gdje su i modelom štapova naznačeni aminokiselinski ostaci u interakciji. (Preuzeto iz Chimnaronek et al, 2005).

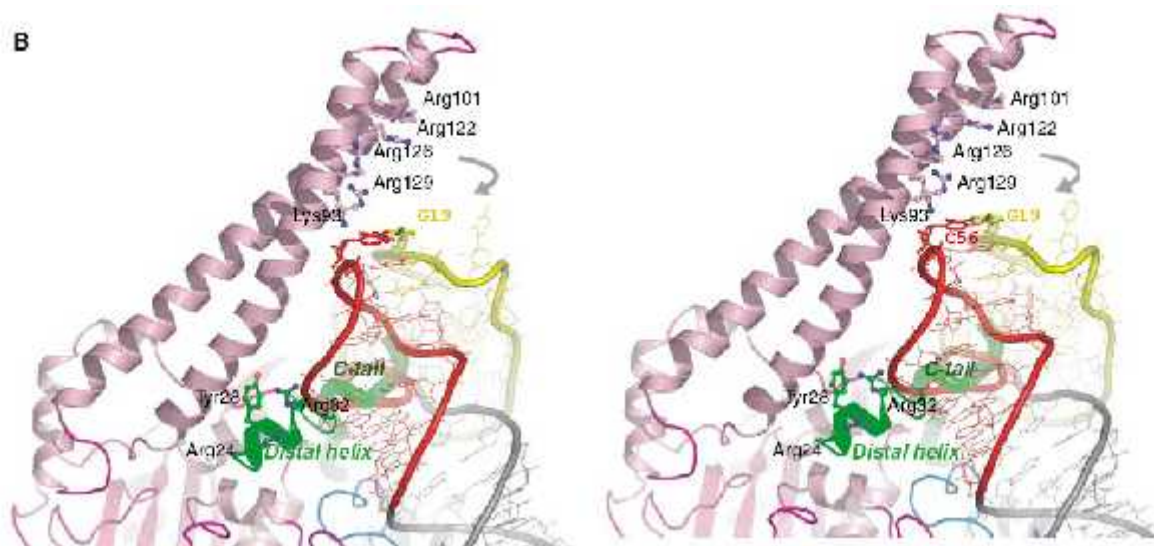
## 4.2 Mehanizam prepoznavanja mt tRNA<sup>Ser</sup>

Inspekcijom površinskog elektrostatskog potencijala enzima i usporedbom s bakterijskim analogom, uočene su dvije odvojene pozitivne površine - na jednoj strani helikalne ruke, površina od 4 bazične aminokiseline (Lys93, Arg122, 126, 129) i, neekvivalentno, u pukotini formiranoj između C-repa i petlje (Arg199-His205). Bakterijski tip SerRS, s druge strane, ima puno šire regije pozitivnih elektrostatskih površina koje se protežu uzduž cijele helikalne ruke. (Sl.13.)



**Slika 13.** Elektrostatska površina monomera bakterijske (lijevo) i mt (desno) SerRS. Plava boja označava pozitivan elektrostatski potencijal, a crvena negativni. (Preuzeto i prilagođeno iz Chimnaronek et al, 2005)

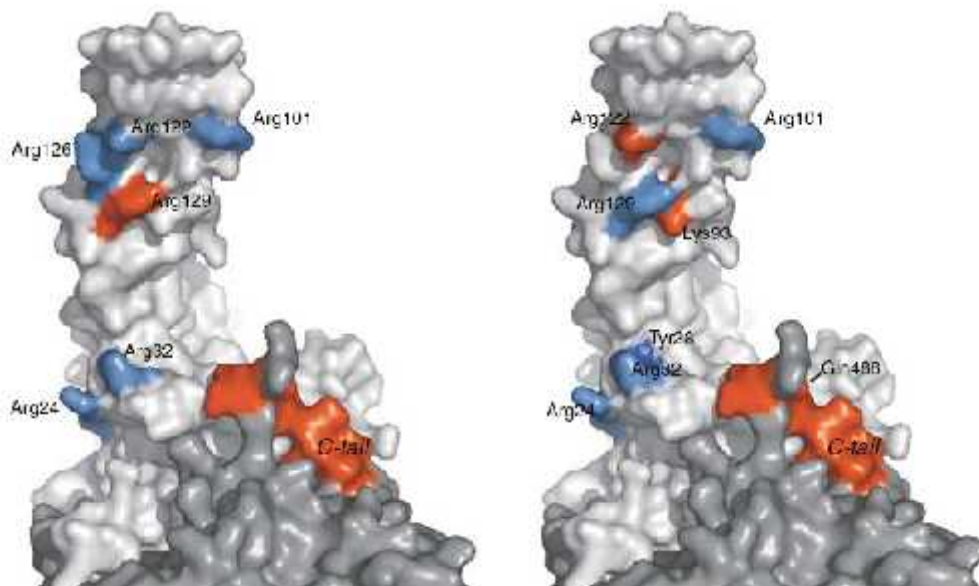
Predlaže se model (Sl. 14.) u kojem je mt tRNA<sup>Ser</sup> u RNA-sendvi u izme u tri odvojene regije mt SerRS (distalnog heliksa, C-repa i pozitivne površine helikalne ruke). Distalni heliks i C-rep u modelu interagiraju s velikim utorom jedne strane akceptorske peteljke, dok pozitivna površina helikalne ruke istovremeno interagira s drugom stranom akceptorske peteljke, zaključavajući tako T-petlju mt tRNA<sup>Ser</sup> (Chimnaronek et al, 2005). Takav model u potpunosti je suprotan bakterijskom, a vjerojatno i eukariotskom, gdje je helikalna ruka SerRS u proteinskom sendvi u izme u varijabilne ruke i T-petlje tRNA<sup>Ser</sup>.



**Slika 14.** Model RNA-sendvi a u kojem je T-petlja mt tRNA<sup>Ser</sup><sub>UGA</sub> opkoljena s tri zasebne regije enzima (zeleni distalni heliks i cijev C-repa te fleksibilna zavojnica koja se pomiće prema T-petlji što je naznačeno strelicom). Aminokiseline u interakciji s T-petljom prikazane su modelom štapova. (Preuzeto i prilagođeno iz Chimnaronek et al, 2005)

Nadalje, u prepoznavanje pojedinih mt tRNA<sup>Ser</sup> uključen je poseban set aminokiselina za svaki izoakceptor (Sl.15.) – Arg24, Tyr28 i Arg32 distalnog heliksa i Lys93, Arg122 bazi ne površine helikalne ruke presudni su u interakciji s tRNA<sup>Ser</sup><sub>UGA</sub>, dok su za drugu, tRNA<sup>Ser</sup><sub>GCU</sub>, presudne Arg24 i Arg32 (aminokiseline koje omeđuju distalni heliks s obje strane) te Arg129 helikalne ruke. 11 aminokiselina

C-repa (His478-Gln488) su esencijalne u prepoznavanju oba izoakceptora serina (Chimnarok et al, 2005).



**Slika 15.** Aminokiselinski ostaci uključeni u prepoznavanje mt  $tRNA^{Ser}_{GCU}$  (lijevo) i  $tRNA^{Ser}_{UGA}$  (desno) mapirani na površinu dimerne strukture mt SerRS. Plavo su obojene efektivni, a crveno presudni ostaci (Preuzeto i prilagođeno iz Chimnarok et al, 2005).

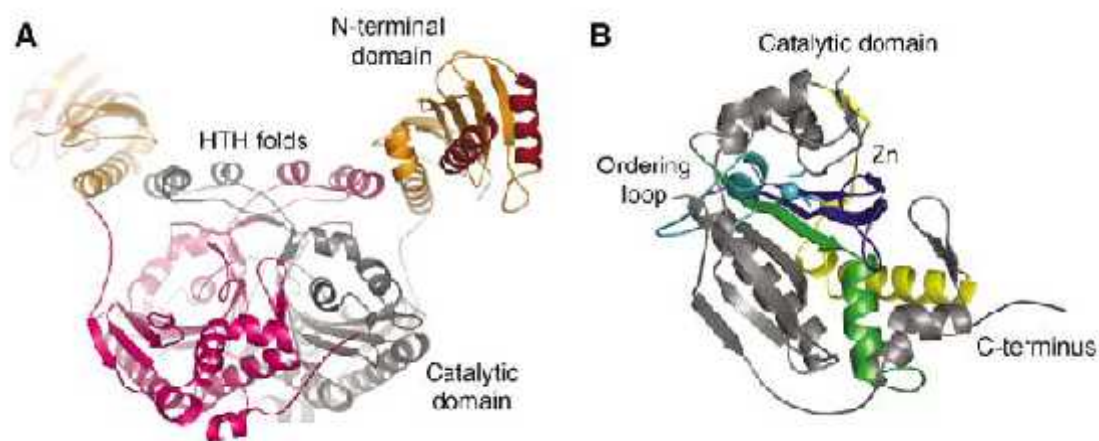
C-rep vjerojatno igra i ulogu u dvojnog na inu prepoznavanja i diskriminacije ta dva izoakceptora mt SerRS – naime, mt izoakceptori serina nisu analogni s obzirom na primarnu i sekundarnu strukturu, te je mehanizam vezanja na mt SerRS nužno drukčiji. Mt SerRS tako alternativno kombiniraju mjesta prepoznavanja prilikom vezanja  $tRNA^{Ser}$ . Moguće je da vrše diskriminaciju na temelju karakterističnog oblika izoakceptora, skeniraju i im fosfatno-šesterenu okosnicu pri čemu koriste bazične ostatke helikalne ruke (prethodno utvrđeno za bakterijski tip SerRS – Biou et al, 1994). Lys93 helikalne ruke je dobar kandidat za nadzornika prisustva kritične tercijarne interakcije baza G19-C56 D-T C petlje jednog od izoakceptora,  $tRNA^{Ser}_{UGA}$ .

Ovo je prvi primjer takvog sustava u kojem aaRS koristi različite mehanizme pri prepoznavanju zasebnih izoakceptorskih tRNA koje posjeduju specifične identitetne elemente (Chimnarok et al, 2005).

## 5 Metanogeni tip SerRS

Homodimerni je enzim, građen od katalitičke domene i N-terminalne ekstenzije, što je ujedno i karakteristika koju dijeli s bakterijskim tipom SerRS (Cusack et al, 1991). Doduše, kristalna struktura SerRS iz metanogene arheje *Methanosarcina barkeri* otkrila je neka strukturalna obilježja koja čine taj tip enzima bitno drukčijim od ostala tri tipa SerRS predstavljenih u ovom seminarskom radu – naime, N-terminalna domena bitno je veća i ne čini ju tipična dvostruka  $\alpha$ -zavojnica (“coiled-coil”), a aktivno mjesto C-terminalne domene sadržava cinkov ion uključen u katalitičku važnu koordinaciju supstrata. Unatoč bitnim strukturalnim razlikama, N-terminalna domena vjerojatno zadržava funkciju vezanja pripadne tRNA i u metanogenom tipu SerRS te je u sličnom položaju u odnosu na svoju katalitičku domenu kao i kod SerRS bakterijskog tipa (Sl.16.)

### 5.1 Struktura SerRS metanogene arheje *Methanosarcina barkeri*



**Slika 16.** A – struktura SerRS *M. barkeri*, katalitičke domene su obojane ružičasto i sivo, N-terminalna narančasto s istaknutim crvenim zavojnicama koji sudjeluju u vezanju tRNA. B – katalitička domena, s motivima 1, 2, 3 obojanima redom žuto, plavo i zeleno. Svijetloplavo su naznačeni cink, koordinirajuće aminokiseline te uređujuća petlja serina. (Preuzeto i prilagođeno iz Bilokapic et al, 2006)

N-terminalnu domenu čine 6-lanana antiparalelna  $\beta$ -ploha, s jedne strane okružena snopom triju zavojnica (H1, H2, H4) te još jednom zavojnicom koja se

pruža gotovo okomito na H4 (H3). Kataliti ka domena, s druge strane, tipična je 8-lanana antiparalelna β-ploha, koju nalazimo i u ostalim vrstama SerRS. Međutim, organizacija aktivnog mjesta je u potpunosti drukčija (Sl.16.B) – ion cinka ( $Zn^{2+}$ ) tetraedarski je koordiniran trima konzerviranim aminokiselinama (Cys306, Glu355, Cys461), dok je na četvrtom koordinacijskom mjestu voda. Dakle cink igra katalitičku, a ne strukturalnu ulogu, jer se disocijacijom vode oslobađa mjesto za koordinaciju supstrata (tj. bočnog ogranka serina).

Biološka važnost cinka u katalizi potvrđena je analizom ovisnosti proteinskih bočnih ogrankova koji ga koordiniraju. Uz metanogenu SerRS još dvije vrste aaRS u aktivnom mjestu sadrže cink – ThrRS (klasa II) i CysSR (klasa I). Aminokiselinski ostaci koji vežu cink su na ekvivalentnim pozicijama u primarnoj strukturi i u tim aaRS (Bilokapic et al, 2006).

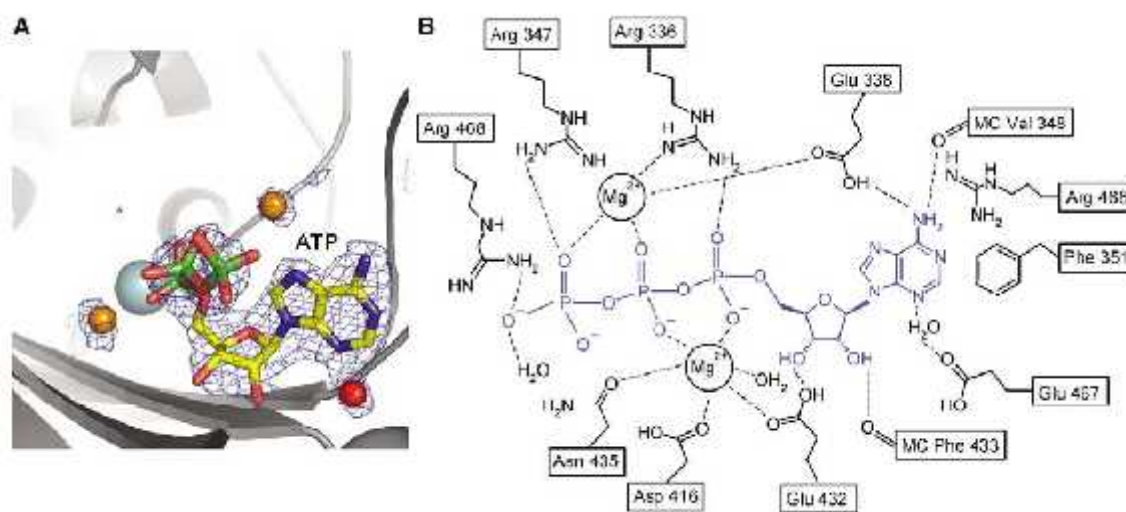
Osim navedenih razlika u aktivnom mjestu, ovisni motivi C-terminalne domene su dodatno izmijenjeni – motiv 2 je nekoliko aminokiselina duži te postoje dvije insercije između pojedinih motiva. Između motiva 1 i 2 smjestila se 30 aminokiselina dugačka HTH domena (“helix-turn-helix”) koja je u bliskom kontaktu sa srži te N-terminalnom domenom druge podjedinice homodimera. Ta interdomenska interakcija istovremeno zaključava dvije srži zajedno ispreplitanjem dvaju zavojnica te stvara nabijenu površinu jedne od njih za stvaranje solnih mostova sa zavojnicom H4 N-terminalne tRNA vezne domene (Bilokapic et al, 2006). Druga insercija u katalitičkoj domeni metanogenog tipa SerRS jest uređivača serinska petlja, analogna uređivaču treoninskoj petlji ThrRS, koja se pomiče uslijed vezanja treonina, što je i vjerojatna uloga serinske petlje (Sl.16.B).

## 5.2 Vezno mjesto za ATP

SerRS metanogenog tipa posjeduje tipično vezno mjesto za ATP nalik svim sintetazama klase II. ATP je u savinutoj konformaciji u obliku slova U s fosfatima koji su zavijenima natrag prema adeninu. Takav raspored odgovara predloženom  $S_N2$  mehanizmu reakcije SerRS klase II, gdje je potrebno da karboksilni kisik serina bude u liniji s fosfatom. Ovakva konformacija postignuta je preko interakcija fosfata s proteinskim bočnim ograncima. Ioni  $Mg^{2+}$  posreduju u takvim interakcijama (Sl. 17.) Adeninski prsten je u “stacking” interakcijama s nepromjenljivim ostacima motiva 2 i



3, Phe351 i Arg468. Svi aminokiselinski ostaci u interakciji s ATP-om su konzervirani ili konzervirano zamijenjeni u svim bakterijskim i metanogenim SerRS (Sl.17.).



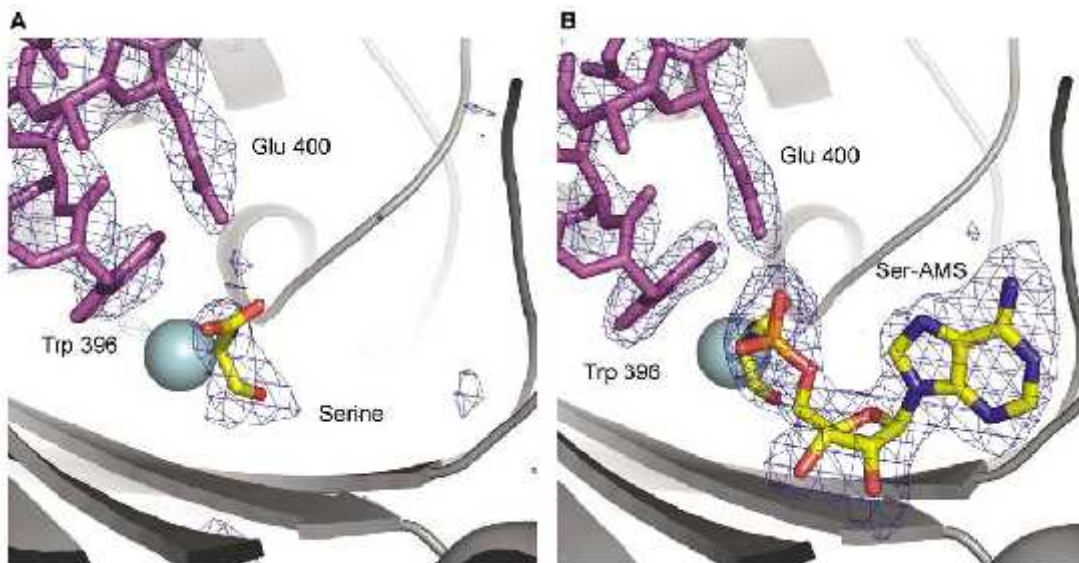
**Slika 17.** Vežanje ATP-a na SerRS, A – protein je nacrtan sivim trakama, cink je plava kugla, a voda i magnezij su crvene i narančaste kugle. B – Shematski prikaz s naznačenim konzerviranim ostacima. (Preuzeto iz Bilokapic et al, 2006)

### 5.3 Vezno mjesto za serin

Amino skupina serina veže se na mjesto vode na 4. koordinacijskom mjestu cinka ne remete i tetraedarsku koordinacijsku sferu cinka. Dvostruku ulogu u metanogenih enzima igra konzervirani Glu355 koji, uz to što veže cink, interagira s hidroksilnom skupinom serina kao u bakterijskom tipu SerRS.

Vežanje serina uzrokuje promjenu konformacije ure uju e serinske petlje (394-410) koja je ina e u potpunosti neure ena. Promjena pozicionira petlju u neposrednu blizinu cinkovog iona, gdje Glu400 i karbonilni kisik serina stupaju u interakciju (Sl.18.). Trp396 pakira se iznad amino kraja serina i na taj na in odre uje veli inu aminokiselinskog veznog džepa jer ukoliko interakcija ne bi bila uspostavljena, cijela ure uju a petlja bila bi sprije ena u promjeni konformacije.

Serinski i adeninski dio ostaju vezani na isti na in u kompleksu Ser-AMS SerRS (Sl.18.) što ukazuje na injenicu da prvo dolazi do aktivacije serina, bez vezanja tRNA (koja bi eventualno promijenila konformaciju) kao što je to slu aj za neke aaRS klase I.



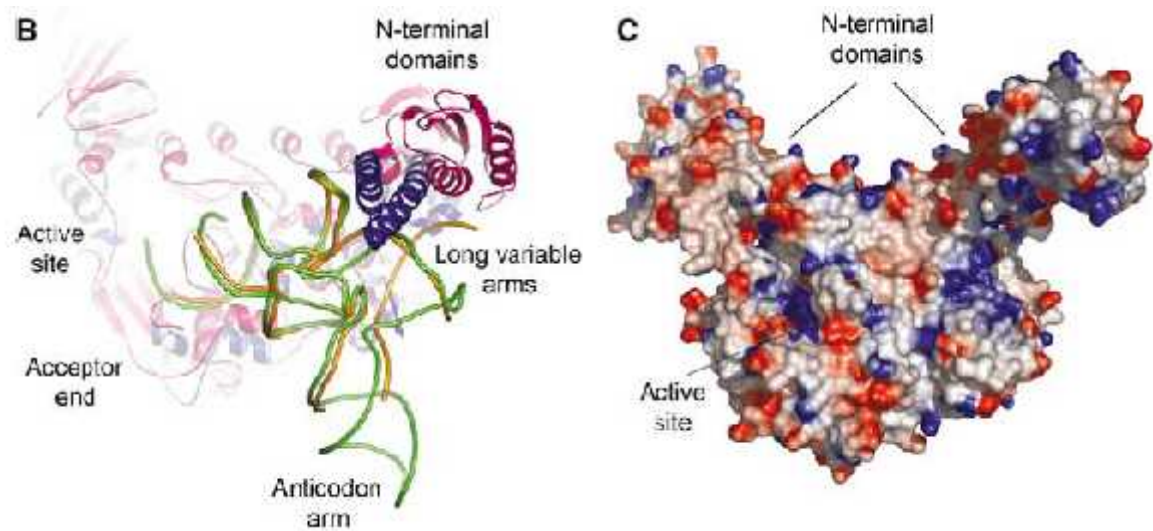
**Slika 18.** Aktivno mjesto SerRS s vezanim serinom (A) te aktiviranim serinom, Ser-AMP (B).  
(Preuzeto i prilagođeno iz Bilokapic et al, 2006)

## 5.4 Interakcije s tRNA<sup>Ser</sup>

Izrađen je “docking” model s ciljem dobivanja opće slike interakcije pripadne tRNA s metanogenom SerRS. Krenulo se s bakterijskim kompleksom SerRS-tRNA<sup>Ser</sup> te su se na odgovarajućem dio kompleksa superponirale katalitičke domene dimera metanogenog tipa SerRS. Zbog djelomične neuravnoteženosti tRNA<sup>Ser</sup> *T. thermophilus* u kompleksu, superponiran je strukturalni model tRNA<sup>Tyr</sup> s dugom varijabilnom rukom čiji položaj se znatno razlikuje u odnosu na tRNA<sup>Ser</sup>. Podaci dobiveni iz “docking” modela pokazuju da je interakcija uvelike slična bakterijskoj usprkos velikim razlikama u strukturi N-terminalne domene SerRS. Duga varijabilna ruka tRNA je pozicionirana za interakciju s visoko konzerviranim zavojnicama H1 i H2 (N-terminalne domene), koje su se inače, u proračunima elektrostatskog potencijala dimera, pokazale kao dio pozitivne površine i zato su vjerojatno u interakciji s negativnom okosnicom tRNA. (Sl.19.)

Superponiranjem katalitičkih domena oba monomera postaje jasno da je jedna od tRNA-vezanih domena pomaknuta za kut od 20° u odnosu na drugu. Fleksibilnost te domene upućuje na zaključak o mehanizmu otvaranja-zatvaranja u odnosu na katalitičku domenu prilikom vezanja tRNA.





**Slika 19.** (B) Predloženi model vezanja tRNA na SerRS – superponirane su ruži asta SerRS metanogenog i plava bakterijskog tipa. Zeleno je obojana tRNA<sup>Tyr</sup>, a naranasto tRNA<sup>Ser</sup>. Strelicom iznad N-terminalne domene je naznačen potreban zglobni pokret te domene prema dugoj varijabilnoj ruci tRNA. (C) Elektrostatski profil otapalu izložene površine – posebno su naznačene plavo obojene pozitivne regije na N-terminalnoj domeni (Preuzeto i prilagođeno iz Bilokapic et al, 2006).

## 6 LITERATURA

- Bilokapic S, Maier T. Structure of the unusual seryl-tRNA synthetase reveals a distinct zinc-dependent mode of substrate recognition. *EMBO J* 2006; **25**:2498-2509
- Biou V, Yaremchuk A. The 2.9 Å crystal structure of *Thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Ser</sup>. *Science* 1994; **263**:1404-1410
- Chimnarong S, Gravers Jeppesen M. Dual-mode recognition of noncanonical tRNA<sup>Ser</sup> by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria. *EMBO J* 2005; **24**:3369-3379
- Cusack S, Yaremchuk A, Tukalo M. The crystal structure of the ternary complex of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA<sup>Ser</sup> and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site. *EMBO J* 1996; **15**:2834-2842
- Cusack S. Eleven down and nine to go. *Nature Struct. Biol.* 1995; **2**:824-831
- Cusack S, Berthet Colominas C. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* 1990; **347**:249-255
- Fujinaga M, Berthet-Colominas C. Refined crystal structure of the seryl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1993; **234**:222-233
- Helm M, Brule H. Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* 2000; **6**:1356-1379
- Itoh Y, Sekine S. Crystallographic and mutational studies of seryl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *RNA Biol.* 2008; **5**:169-177
- Shimada N, Suzuki T. Dual mode recognition of two isoacceptor tRNAs by mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 2001; **276**:46770-46778
- Soma A, Himeno H. Cross-species aminoacylation of tRNA with a long variable arm between *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**:4374-81
- Sprinzi M, Horn C. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 148-153
- Vincent C, Borel F. Seryl-tRNA synthetase from *E. coli*: functional evidence for cross-dimer tRNA binding during aminoacylation. *Nucleic Acids Res.* 1995; **23**:1113-1118.

Weygand-Durasevic I, Ban N. Yeast seryl-tRNA synthetase expressed in *Escherichia coli* recognizes bacterial serine-specific tRNAs in vivo. Eur J Biochem 1993; **214**:869-77

Yokogawa T, Shimada N. Characterization and tRNA recognition of mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. J Biol Chem 2000; **275**:19913–19920

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=445736&width=400&height=400>

## 7 SAŽETAK

Seril-tRNA sintetaza klase IIa seriliraju odgovarajuće tRNA<sup>Ser</sup> u visoko specifičnoj reakciji u dva koraka. Zbog brojnosti i raznolikosti serinskih kodona, duga varijabilna ruka tRNA<sup>Ser</sup> preuzima ulogu glavnog identitetnog elementa, dok antikodon nije element prepoznavanja. Ona u interakciji s konzerviranom helikalnom rukom SerRS uvjetuje specifično prepoznavanje enzima i supstrata. Helikalna ruka je fleksibilni N-terminalna 60 Å duga dvostruka zavojnica, koja se uslijed vezanja tRNA poprijeko sintetaznog dimera, što je još jedna od specifičnosti tRNA<sup>Ser</sup>/SerRS sustava, “zaključava” između T i C i duge varijabilne ruke u *proteinski sendvič* izvode i pritom zglobni pokret prema katalitičkoj podjedinici. Akceptorska peteljka se istovremeno ispravno pozicionira u aktivnom mjesto uz pomoć petlje konzerviranog motiva 2 koji također doživljava konformacijske promjene. Katalitička domena je 7- ili 8-lanana antiparalelna  $\beta$ -ploča. Opisani sustav tipičan je bakterijski tRNA<sup>Ser</sup>/SerRS sustav, vrlo sličan arhealno-eukariotskom i mitohondrijskom, ali poprilično različit od metanogenog. Osim razlika u dizajnu i kemiji aktivnog mjesta (s katalitičkim cinkom), metanogene SerRS sadržavaju dvije strukturalne insercije u katalitičkoj domeni – HTH (povećava interakcijsku površinu i pozicionira N-terminalnu domenu) i uređuju u serinsku petlju. N-terminalna domena, iako u potpunosti izmijenjene strukture ( $\beta$ -ploče i  $\beta$ -zavojnice) zadržava specifičnu orijentaciju u odnosu na katalitičku domenu. Sustav koji značajnije odstupa od bakterijskog jest i mitohondrijski – naime, mitohondrijske sintetaze gubitak varijabilne ruke izoakceptorskih mt tRNA<sup>Ser</sup> nadoknađuju stjecanjem novih strukturalnih elemenata, distalnog heliksa i C-repa koji zajedno s regijama tipične helikalne ruke zaključavaju T-petlju (novi identitetni element) u *RNA-sendvič*. Arhealno-eukariotski sustav, uz tipičnu helikalnu domenu, sadrži arhealno-specifičnu inserciju, koja zajedno sa sržnom domenom stvara bazični tunel koji vodi u aktivno mjesto. Treba spomenuti i “isti” eukariotski sustav koji je vrlo sličan bakterijskom, ali sadržava C-terminalne produžetke. Oni dodatno stabiliziraju enzim slično HTH motivu SerRS metanogenog tipa.

## 8 SUMMARY

Seryl-tRNA class IIa synthetases serylate cognate tRNA<sup>Ser</sup> in a highly specific two-step reaction. Because of the size and poor preservation of the serine codon sequence, long variable arm tRNA<sup>Ser</sup> takes up the role of the main identity elements from the otherwise common anticodon. The extra arm conditions specific enzyme-substrate recognition through interactions with the conserved helical arm of SerRS. Helical arm is a flexible N-terminal 60 Å long coiled-coil, which locks itself between T<sup>1</sup> C and the long extra arm into what is called a *protein sandwich*, while making a hinge movement in respect to the catalytic domain. It only does so once the tRNA is bound across the synthetase dimer, which seems to be another specificity of the tRNA<sup>Ser</sup>-SerRS system. At the same time, motif 2 loop, which experiences conformational changes itself, helps in properly positioning the acceptor stem in the active site. Catalytic domain is a 7- or 8-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet. The system just described is a typical bacterial tRNA<sup>Ser</sup>/SerRS system, very similar to archeal/eukaryal and mitochondrial, but substantially different from the methanogenic system. Besides the differences in the design and chemistry of the active site (catalytic zinc), methanogenic SerRSs differ in having two structural insertions in the catalytic domain – HTH (increases the dimer interface) and “serine ordering loop”. In spite of a completely different structural organization of the N-terminal domain, it retains a common orientation in relation to the catalytic domain. Another system that deviates from the typical is the mitochondrial one – in fact, mitochondrial synthetases compensate the loss of the mt tRNA<sup>Ser</sup> extra arm by acquiring new structural elements – the distal helix and the C-tail – which alongside certain helical arm regions lock the T-loop (a novel identity element) into an *RNA-sandwich*. Archeal/eukaryal system, in addition its typical helical domain, contains an archae-specific insertion, which collaborates with the core domain in forming a basic channel leading to the active site. It should be mentioned that the “pure” eukaryal system resembles greatly the bacterial, with slight insertional changes to the enzyme’s C-terminus additionally stabilize the enzyme (similar to the methanogenic HTH motif).